

METHODEN DER SPURENANALYTISCHEN BESTIMMUNG VON ESTROGENEN IM ABWASSER

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

`d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m`

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Apothekerin Eva-Christina Zorn

geboren am 15.09.1970 in Ehringshausen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. M. Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. P. Surmann

2. Prof. Dr. W. Kloas

eingereicht am: 31.03.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2003

Meiner Mutter

Das Prinzip aller Dinge ist das Wasser,
denn Wasser ist alles,
und ins Wasser kehrt alles zurück.

THALES VON MILET

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. P. Surmann, dem ich an dieser Stelle besonders danken möchte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Arbeitskreiskollegen und Mitarbeitern des Instituts für die stets freundschaftliche und angenehme Zusammenarbeit.

Frau Renate Feuerherdt gilt mein besonderer Dank für die sehr tatkräftige, umfangreiche und gewissenhafte Unterstützung in allen Belangen der Probenvorbereitung und Analytik. Herrn Helmar Döhnert danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der GC- und SPME-Methoden und Herrn Dr. Peter Witte für seine Hilfe bei der Durchführung der GC/MS-Messungen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Karl-Heinz Schwarz für seine Unterstützung und vielen Ratschläge im Bereich der Elektrochemie bedanken. Frau Gabriele Schröpfer, Frau Rita Falkenbach und Frau Ingrid Gafron gilt mein Dank für ihre Hilfe bei der Entwicklung der Probenvorbereitungstechniken.

Für die Bereitstellung der Abwasserproben danke ich den Berliner Wasserbetrieben. Mein besonderer Dank gilt hier Herrn Träder und Herrn Grunwald vom Klärwerk Falkenberg.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei Lothar bedanken, der durch seine stete Unterstützung einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS v****1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1****2 THEORETISCHER TEIL 7****2.1 UNTERSUCHTE ESTROGENE..... 7**

2.1.1 VORKOMMEN, WIRKUNG UND VERWENDUNG 7

2.1.2 STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN 8

2.2 UNTERSUCHUNGSMATRIX ABWASSER 11**2.3 PROBENVORBEREITUNG..... 12**

2.3.1 FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (LLE) 13

2.3.2 FESTPHASENEXTRAKTION (SPE) 13

2.3.3 FESTPHASENMIKROEXTRAKTION (SPME)..... 14

2.3.4 WEITERE METHODEN DER PROBENVORBEREITUNG 19

2.3.5 DERIVATISIERUNG 20

2.3.5.1 Derivatisierung für die Gaschromatographie 21

2.3.5.2 Derivatisierung zur Verbesserung von Selektivität, Empfindlichkeit und/oder
Nachweis- und Bestimmungsgrenze 22

2.3.5.3 Möglichkeiten der Derivatisierung der Estrogene 23

2.4 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYTIK..... 24

2.4.1 VOLTAMMETRIE 24

2.4.1.1 Adsorption an Kohlenstoffelektroden..... 25

2.4.1.2 Cathodic Stripping an Quecksilber 25

2.4.2 CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN 26

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 27**3.1 VOLTAMMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN..... 27**

3.1.1 ADSORPTION AN KOHLENSTOFFELEKTRODEN..... 27

3.1.2 CATHODIC STRIPPING AN QUECKSILBER 27

3.2	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	31
3.2.1	UV-DETEKTION (UVD)	31
3.2.2	ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION (ELCD)	33
3.3	GASCHROMATOGRAPHIE (GC)	39
3.3.1	GC DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG	39
3.3.2	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG	43
3.3.3	DERIVATISIERUNG DER ESTROGENE	46
3.3.3.1	Auswahl der Derivatisierungsmethode	46
3.3.3.2	Ermittlung geeigneter Silylierungsbedingungen für die Estrogene	48
3.3.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG	57
3.4	FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (LLE)	61
3.4.1	OPTIMIERUNG DER PARAMETER	61
3.4.2	ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS HPLC	62
3.4.2.1	Extraktionsmittel	63
3.4.2.2	Probenlösung	64
3.4.3	LLE-GC/MS	66
3.4.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG NACH LLE	70
3.4.5	SORBENSGESTÜTZTE FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (SLLE)	71
3.4.5.1	Optimierung der Parameter	71
3.4.5.2	Überprüfung der Parameter mittels HPLC	71
3.5	FESTPHASENEXTRAKTION (SPE)	73
3.5.1	OPTIMIERUNG DER PARAMETER	73
3.5.2	ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS HPLC	75
3.5.2.1	Auswahl des Sorbens	75
3.5.2.2	Probenlösung	78
3.5.2.3	Auswahl des Elutionsmittels	78
3.5.2.4	Abtrennung von Matrixbestandteilen	79
3.5.2.5	Trocknung der Kartuschen	81
3.5.3	ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNG	82
3.5.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG NACH SPE	84
3.5.4.1	Kalibrierung der Estrogene mittels SPE-HPLC/ELCD	84
3.5.4.2	Kalibrierung der Estrogene mittels SPE-GC/MS	86

3.6	FESTPHASENMIKROEXTRAKTION (SPME)	89
3.6.1	OPTIMIERUNG DER PARAMETER	89
3.6.2	ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS GC/FID	95
3.6.2.1	Art der Faserbeschichtung	97
3.6.2.2	Anreicherungstemperatur	98
3.6.2.3	Anreicherungszeit	99
3.6.2.4	Rührgeschwindigkeit	101
3.6.2.5	Volumen	102
3.6.2.6	pH-Wert	103
3.6.2.7	Methanolgehalt	105
3.6.2.8	Salzgehalt	106
3.6.2.9	Desorptionstemperatur	108
3.6.2.10	Desorptionszeit	109
3.6.3	ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNGSVERSUCHE	110
3.6.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH SPME	113
3.6.5	MEHRFACHANREICHERUNG	115
3.6.6	DERIVATISIERUNG	116
3.6.6.1	Derivatisierung nach der Anreicherung direkt an der Faser	117
3.6.6.2	Derivatisierung nach Desorption im GC	122
3.6.7	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG AN DER FASER	124
3.6.8	VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN AN SPME-PHASEN	127
3.6.8.1	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	127
3.6.8.2	Anpassung eines Anreicherungsmodells am Beispiel von Estron	131
4	<u>VERGLEICH UND DISKUSSION DER ENTWICKELTEN ANALYSEVERFAHREN</u>	135
5	<u>ANWENDUNG DER METHODEN AUF DIE MESSUNG VON REALPROBEN</u>	139
5.1	SPE-GC/MS	139
5.2	SPME-GC/MS	140
5.3	ERGEBNISSE	140
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	142

7 EXPERIMENTELLER TEIL	145
7.1 MATERIALIEN UND GERÄTE	145
7.1.1 CHEMIKALIEN	145
7.1.2 GERÄTE UND ARBEITSBEDINGUNGEN.....	149
7.1.2.1 Voltammetrie	149
7.1.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	150
7.1.2.3 Festphasenextraktion (SPE)	150
7.1.2.4 Festphasenmikroextraktion (SPME).....	151
7.1.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	152
7.1.2.6 Gaschromatographie (GC)	155
7.1.2.7 Weitere Geräte	157
7.2 ARBEITSVORSCHRIFTEN	158
8 ANHANG	166
8.1 WERTETABELLEN	166
8.1.1 VOLTAMMETRIE	166
8.1.2 HPLC/UVD	167
8.1.3 HPLC/ELCD.....	167
8.1.4 KALIBRIERUNG DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG – GC/FID UND GC/MS	169
8.1.5 KALIBRIERUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG – GC/MS.....	171
8.1.6 SPE-GC/MS.....	173
8.1.7 SPME – OPTIMIERUNG DER PARAMETER.....	175
8.1.8 SPME – KALIBRIERUNG OHNE DERIVATISIERUNG	185
8.1.9 SPME – KALIBRIERUNG NACH DERIVATISIERUNG	186
8.1.10 SPME – VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN	188
8.1.11 REALPROBEN.....	191
8.2 MASSENSPEKTREN.....	193
8.2.1 ESTROGENE – OHNE DERIVATISIERUNG	193
8.2.2 ESTROGENE – NACH DERIVATISIERUNG	195
LITERATURVERZEICHNIS.....	197

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	spezifischer Absorptionskoeffizient
$A_{1\text{cm}}^{1\text{mol}}$	molarer Absorptionskoeffizient
amu	atomare Masseneinheit (atomic mass unit)
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, bidestilliertes Wasser
AS	Autosampler
Atune	automatisches Tuning (automatic tuning)
BG	Bestimmungsgrenze
BSA	N,O-bis(Trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	N,O-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid
BTX	B enzol, T oluol, X ylol; (alkylsubstituierte Benzole)
BWB	Berliner Wasserbetriebe
C24	Lignocerinsäure, Tetracosansäure
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
c_f, c_s, c_h, c_o	Konzentration in der Faser, Konzentration in der Lösung, Konzentration in der Gasphase, Ausgangskonzentration der Lösung
d_2 -E2	Estradiol- d_2 , β -
DIN	Deutsches Institut für Normung
DME	Quecksilbertropfelektrode (dropping mercury electrode)
DMF-DMA	N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal
DOC	gelöster organ. gebundener Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
DPP	differentielle Pulspolarographie
DTE	Dithioerythrit
DVB	Divinylbenzen, Divinylbenzol
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
E1	Estron
E2	β -Estradiol
E2-17ac	Estradiol-17-acetat
E3	Estriol
EC	endcapped
ECD	Elektroneneinfangdetektor (electron capture detector)
EE2	17 α -Ethinylestradiol
EI	Elektronenionisation (electron ionization, electron impact)

Eisens	electron ionization sensitivity tuning
ELCD	elektrochemische Detektion, elektrochemischer Detektor
EPA	Environmental Protection Agency
FIA	Fließinjektionsanalyse (flow injection analysis)
FID	Flammenionisationsdetektor (flame ionization detector)
FM	Fließmittel
GC	Gaschromatographie, Gaschromatograph
GCB	nicht poröser, graphitisierter Kohlenstoff (graphitized carbon black)
HMDE	hängende Quecksilbertropfelektrode (hanging mercury drop electrode)
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
HRMS	hochauflösende(s) Massenspektrometer/Massenspektrometrie (high resolution mass spectrometer/spectrometry)
I.D.	Innendurchmesser
ICH	International Conference on Harmonization
IS	interner Standard
KA	Kläranlage
K_a	Adsorptionskoeffizient
KAS	Kaltaufgabesystem
K_{fs} , K_{fh} , K_{hs}	Verteilungskoeffizient Faser/Lösung, Verteilungskoeffizient Faser/Gasphase, Verteilungskoeffizient Gasphase/Lösung
KH	Krankenhaus
K_{ow}	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
l	löslich
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
ll	leicht löslich
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid liquid extraction)
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MBDSTFA	N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid
MBHFBA	N-Methyl-bis(heptafluorbutyramid)
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoracetamid)
MeOH	Methanol

MG	Molekulargewicht
MLLE	Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion (micro liquid liquid extraction)
M_r	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
Mw	Mittelwert
NCI	negative chemische Ionisation
n_f, n_o	Stoffmenge in der Faser, Ausgangsstoffmenge in der Lösung
NG	Nachweisgrenze
n_{\max}	maximal adsorbierbare Stoffmenge
$n_{\text{ver}}, n_{\text{ads}}$	durch Verteilung/Adsorption angereicherte Stoffmenge
P (Grad)	Gradientenpumpe
P (iso)	isokratische Pumpe
p.a.	pro analysi
PA	Polyacrylat (-faser/-phase)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons)
PCB	polychlorierte Biphenyle
PDMS	Polydimethylsiloxan (-faser/-phase)
PFTBA	Perfluortributylamin
ppb	parts per billion ($\mu\text{g/l}$)
ppm	parts per million (mg/l)
ppt	parts per trillion (ng/l)
PTFE	Polytetrafluorethylen
pul	praktisch unlöslich
R	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
RAD	Rezeptoraffinitätsdetektion (receptor affinity detection)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (signal/noise ratio)
SBSE	stir bar sorptive extraction
SDB	Styren-Divinylbenzen, Styrol-Divinylbenzol

SFE	Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten (supercritical fluid extraction)
SIM	selected ion monitoring
sl	schwer löslich
SLLE	sorbensgestützte Flüssig-Flüssig-Extraktion (supported liquid liquid extraction)
SMDE	statische Quecksilbertropfelektrode (static mercury drop electrode)
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction)
Stabw	Standardabweichung
StLsg	Stammlösung
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
s_y	Reststandardabweichung
TBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl-
t_{ex}, t_{de}	Anreicherungszeit, Desorptionszeit
TIC	Totalionenstromchromatogramm
TMAH	Trimethylaniliniumhydroxid
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TMSI	Trimethyliodsilan
TMSIM	N-Trimethylsilyl-imidazol
UVD	UV-Detektion, UV-Detektor
V_f, V_s	Volumen der Faser, Volumen der Lösung
Vk	Variationskoeffizient, relative Standardabweichung
VOC	flüchtige organ. Verbindungen (volatile organic compounds, volatile organic carbon)
wl	wenig löslich

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den letzten zehn Jahren ist mit den Arzneistoffen eine neue Gruppe potentiell öko-toxischer Substanzen in das Augenmerk der Umweltanalytiker gerückt. 1992 konnte im Rahmen einer Reihenuntersuchung auf Herbizide zum ersten Mal Clofibrinsäure, ein Metabolit des Lipidsenkens Clofibrat, im Berliner Grundwasser nachgewiesen werden [STAN, 1992]. Dieser Fund war zwar nicht der erste Hinweis auf das Vorkommen von Arzneistoffen in der Umwelt, er kann aber gewissermaßen als Auslöser einer Vielzahl in der Folge durchgeführter Untersuchungen angesehen werden.

In den 70er und 80er Jahren war noch wenig darüber bekannt, dass Arzneistoffe, ebenso wie z.B. Pestizide oder Industriechemikalien, eine Gefahr für die Umwelt darstellen könnten. Auch waren die analytischen Methoden kaum leistungsfähig genug, um Substanzen in Spurenkonzentrationen von wenigen ng/l qualitativ und quantitativ bestimmen zu können. Einige Autoren diskutierten jedoch bereits zu dieser Zeit den Verbleib der Arzneistoffe in der Umwelt. Als problematisch wurde z.B. das Verhalten der Estrogene im aquatischen System eingestuft [RURAINSKI, 1977], [RATHNER, 1979]; auch die Folgen des Einsatzes von Arzneimitteln in Tierzucht und Tierhaltung schienen genauer untersucht werden zu müssen [COATS, 1976]. Bereits im Jahr 1977, also 15 Jahre vor der eingangs erwähnten Literaturstelle, berichtete Hignite et al. vom Nachweis der Clofibrinsäure in amerikanischen Kläranlagen [HIGNITE, 1977].

Die Zahl der Publikationen zu Arzneimittelrückständen in der Umwelt stieg gerade in den letzten Jahren stark an. Bis heute konnten bereits mehr als 80 pharmazeutisch relevante Verbindungen und deren Metabolite in Umweltproben nachgewiesen werden [HEBERER, 2002]. Tabelle 1.1 auf der folgenden Seite zeigt eine Auswahl der in der Umwelt detektierten Arzneistoffe.

Tabelle 1.1: Auswahl von Literaturangaben zu Arzneimittelrückständen in der Umwelt

KA=Kläranlage, KH=Krankenhaus; analytische Methoden: siehe Abkürzungsverzeichnis

Literaturangaben: [1] SULING, 2000, [2] WEIGEL, 2002, [3] AHRER, 2001, [4] STUMPF, 1998, [5] HIRSCH, 1996, [6] HARTIG, 2000, [7] HIRSCH, 1998, [8] HARTMANN, 1998, [9] MEISENHEIMER, 2000, [10] KUCH, 2000, [11] WEGENER, 1999, [12] STUMPF, 1996, [13] HEBERER, 1995, [14] STAN, 1994, [15] HIRSCH, 2000, [16] STEGER-HARTMANN, 1996, [17] STEGER-HARTMANN, 1997

Arzneistoff- gruppe	Arzneistoff	analytische Methode	Umwelt- kompartiment	Konzentration	Lit.
Analgetika/ Anti- rheumatika	Acetylsalicyl- säure	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 0,31 µg/l	[1]
			Weser	max. 44 ng/l	[1]
			KH-Abwasser	max. 24,6 µg/l	[1]
	Diclofenac	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 0,7 µg/l	[1]
			Weser	max. 17 ng/l	[1]
			KH-Abwasser	max. 2,38 µg/l	[1]
			Elbe	6,2 ng/l	[2]
			LLE/SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 392,1 ng/l
	Ibuprofen	SPE-GC/MS	Elbe	0,6 ng/l	[2]
KA-Ablauf			max. 1,9 µg/l	[4]	
Naproxen	LLE/SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 38,2 ng/l	[3]	
Anti- asthmatika	Salbutamol	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 174 ng/l	[5]
	Terbutalin			max. 115 ng/l	[5]
Antibiotika/ Chemo- therapeu- tika	Sulfadiazin	SPE-LC/MS/MS	KA-Ablauf	31 ng/l	[6]
	Sulfamerazin			37 ng/l	[6]
	Sulfmethoxazol			744 ng/l	[6]
	Erythromycin	Lyophilisation- LC/MS/MS	Fluss (Bielefeld)	0,62 µg/l	[7]
	Clarithromycin			0,19 µg/l	[7]
	Roxithromycin			0,19 µg/l	[7]
	Trimethoprim			0,12 µg/l	[7]
	Ciprofloxacin	LC/Fluoreszenz	KH-Abwasser	3-87 µg/l	[8]
Anti- epileptika	Carbamazepin	SPE-GC/MS bzw. LC/MS/MS	Rhein	max. 0,25 µg/l	[9]
			Grundwasser	max. 0,05 µg/l	[9]
Beta- blocker	Metoprolol	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 2,2 µg/l	[5]
	Propranolol		versch. Flüsse	max. 1,54 µg/l	[5]
			KA-Ablauf	max. 286 ng/l	[5]
			versch. Flüsse	max. 98 ng/l	[5]
Hormone	Estron	SPE-GC/MS	KA-Ablauf	max. 13 ng/l	[10]
	β-Estradiol	SPE-GC/MS(/MS)		max. 76 ng/l	[11]
		SPE-GC/MS		max. 21 ng/l	[12]
		SPE-GC/MS(/MS)		max. 13 ng/l	[10]
	Ethinylestradiol	SPE-GC/MS(/MS)		max. 62 ng/l	[12]
				max. 9 ng/l	[10]
				max. 42 ng/l	[11]
Lipid- senker	Clofibrinsäure	SPE-GC/MS		Trinkwasser	10-165 ng/l
			versch. Flüsse	max. 222 ng/l	[14]
			KA-Ablauf	max. 0,7 µg/l	[1]
			Weser	max. 28 ng/l	[1]
			KH-Abwasser	max. 0,06 µg/l	[1]
			Elbe	18 ng/l	[2]
		Nordsee	max. 1,35 ng/l	[2]	
		LLE/SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 43,5 ng/l	[3]
	Bezafibrat	LLE/SPE-CE/MS	Fluss (Österreich)	max. 20,4 ng/l	[3]
Röntgen- kontrast- mittel	Iopamidol	SPE-LC/MS/MS	Oberflächenwasser	0,18 µg/l	[15]
	Iopromid		KA-Ablauf	0,59 µg/l	[15]
			Oberflächenwasser	0,15 µg/l	[15]
			KA-Ablauf	3,07 µg/l	[15]
			Iomeprol	Oberflächenwasser	0,04 µg/l
	KA-Ablauf			2,06 µg/l	[15]
Zytostatika	Ifosfamid	SPE-GC/MS	KH-Abwasser	24 ng/l	[16]
	Cyclo- phosphamid	SPE-GC/MS	KH-Abwasser	146 ng/l	[16]
				0,02-4,5 µg/l	[17]
			KA-Ablauf	7-17 ng/l	[17]

Ein wichtiger Grund für eine mögliche Umweltgefährdung durch Arzneistoffe ist die meist hohe Stabilität der Verbindungen. Gelangen Arzneistoffe in die Umwelt, so werden sie dort oftmals nur langsam abgebaut und inaktiviert. Die Metabolisierung eines Arzneistoffs setzt zwar direkt nach der Einnahme im Organismus ein, die Struktur der Verbindung wird dabei in vielen Fällen jedoch nur geringfügig verändert. Viele Arzneistoffe werden überwiegend renal ausgeschieden, so dass das Hauptziel der körpereigenen Metabolisierung in einer Erhöhung der Hydrophilie besteht. Neben Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen in Phase I der Biotransformation kommt es in Phase II zur Kopplung des Arzneistoffes z.B. an aktivierte Glucuronsäure oder Schwefelsäure. Nach Ausscheidung über den Urin gelangen die Metabolite über das Abwasser in Kläranlagen. Durch Mikroorganismen kann dort eine Spaltung der Konjugate erfolgen, so dass im gereinigten Abwasser neben Phase-I-Metaboliten u.U. sogar wieder die Originalarzneistoffe anzutreffen sind. Über die Vorfluter gelangen diese dann in Oberflächengewässer, also in Flüsse und Seen, und von dort in Abhängigkeit ihrer Wasserlöslichkeit und Stabilität sogar bis ins Grund- oder Trinkwasser.

Der beschriebene Weg über die Einnahme als Medikament und die anschließende Ausscheidung durch den Patienten dürfte als Haupteintragspfad der Pharmaka in die Umwelt angenommen werden. Die unsachgemäße Entsorgung von Arzneimitteln über die Toilette sowie Einträge über Mülldeponien sind mengenmäßig als von untergeordneter Bedeutung einzustufen. Auch Direkteinträge aus der pharmazeutischen Industrie sind aufgrund entsprechender Umweltschutzbestimmungen nicht zu erwarten. Für Arzneimittel, die in der Tierhaltung und -zucht eingesetzt werden, sieht der Weg in die Umwelt jedoch anders aus. Da tierische Exkremente in der Landwirtschaft oftmals als Dünger ausgebracht werden, gelangen Tierarzneimittel praktisch ohne den Umweg über die Kläranlagen direkt in die Umwelt. Aus dem Boden versickern sie ins Grundwasser oder werden in Oberflächengewässer ausgeschwemmt.

Eine weitere Ursache, die zur Ökotoxizität von Arzneimitteln beitragen kann, ist ihre meist hohe pharmakologische Aktivität. Die in der Umwelt anzutreffenden Arzneistoffkonzentrationen liegen zwar meist noch im Bereich von wenigen ng/l (siehe Tabelle 1.1), doch können gerade sehr potente Verbindungen, wie z.B. Hormone, bereits in diesen niedrigen Konzentrationen eine pharmakologische Wirkung zeigen. Gesicherte Erkenntnisse und Beweise zu den Auswirkungen auf die Umwelt liegen für die meisten Arzneistoffe noch nicht vor, doch zeigt gerade das Beispiel der Hormone bzw. allgemein der sogenannten „endocrine disruptors“, dass eine solches Gefährdungspotential tatsächlich besteht.

Bei den „endocrine disruptors“ handelt es sich um eine Gruppe chemisch unterschiedlicher Verbindungen, denen jedoch gemeinsam ist, dass sie störend in das hormonelle System von Mensch und Tier eingreifen können. Eine wichtige Untergruppe der „endocrine disruptors“ sind die „Umweltestrogene“. Zu diesen gehören neben natürlichen und synthetischen weiblichen Hormonen auch Phyto- und Mykoestrogene, sowie sogenannte Xenoestrogene. Bei Letzteren handelt es sich um verschiedene Industrie- und Umweltchemikalien, die ebenfalls eine estrogenen Aktivität aufweisen (Bsp. siehe Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Substanzen mit estrogenen Aktivität – Beispiele für Umweltestrogene

Natürliche Estrogene:	β -Estradiol, Estron, Estriol
Synthetische Estrogene:	17 α -Ethinylestradiol, Mestranol, Diethylstilbestrol u.a.
Phyto- u. Mykoestrogene:	Flavone, Isoflavone, Lignane, Sterole, Zearalenon u.a.
Xenoestrogene:	DDT, Bisphenol A, Alkylphenole, chlorierte Biphenyle u.a.

Die Umweltestrogene unterscheiden sich deutlich in ihrer estrogenen Wirkstärke. In der Reihenfolge steigender estrogenen Potenz sind zunächst die Xenoestrogene, dann die Phyto- und Mykoestrogene und schließlich die natürlichen und synthetischen Estrogene zu nennen.

Im Gegensatz zu den meisten anderen in der Umwelt detektierten Arzneimittel gilt für die „endocrine disruptors“ bzw. speziell für die „Umweltestrogene“ bereits als bewiesen, dass sie in das Ökosystem eingreifen können. So wurden z.B. Verweiblichungserscheinungen bei Fischen in der Nähe von Kläranlagen beobachtet. Versuche mit männlichen Forellen, die in Käfigen in Kläranlagenabläufe eingebracht wurden, bestätigten die Vermutung, dass das gereinigte Abwasser estrogen aktive Substanzen enthalten müsse. Die Forellen wurden nämlich zur Vitellogenin-Produktion stimuliert [PURDOM, 1994]. Bei den Vitellogeninen handelt es sich um spezielle Lipoproteide eierlegender Tierarten, die normalerweise nur von weiblichen Tieren produziert werden. Die Stimulation der Vitellogenin-Synthese bei männlichen Tieren wird als ein empfindlicher Biomarker für eine estrogenen Aktivität angesehen [SUMPTER, 1995]. Welche Substanzen nun aber die estrogenen Aktivität des Abwassers bewirken – ob es die natürlichen oder synthetischen Estrogene mit ihrer relativ hohen Wirkstärke sind, oder die Xenoestrogene, die zwar eine geringere estrogenen Potenz aufweisen, dafür aber in höherer Konzentration vorliegen – konnte auf diese Weise nicht geklärt werden.

Um die estrogenen Aktivität einer Substanz einschätzen zu können, wurden in zahlreichen Screening-Versuchen die in Frage kommenden Umweltchemikalien an Zelllinien getestet. Diese „in vitro“-Tests sind jedoch mit den komplexen Zusammenhängen „in vivo“ nur

schwer vergleichbar, so dass die Untersuchungen keine verlässlichen Aussagen bezüglich der estrogenen Potenz einer Verbindung in der Umwelt liefern [DEGEN, 2000]. Problematisch ist auch, dass nur wenig über Speziesunterschiede bezüglich estrogener Empfindlichkeit bekannt ist. Forellen z.B. reagieren bereits auf umweltrelevante Konzentrationen der natürlichen Estrogene Estron (25-50 ng/l) und Estradiol (1-10 ng/l) mit einer gesteigerten Vitellogenin-Produktion [ROUTLEDGE, 1998]. Doch inwieweit diese Konzentrationen bereits Effekte auf andere Organismen haben, ist noch nicht geklärt; ebenso wenig auch die immer wieder geäußerte Frage, ob die abnehmende männliche Fertilität auf den Einfluss von Umwelttestrogenen zurückzuführen ist [IRVINE, 2000], [TOPPARI, 1998].

Dies sind nur einige wenige der noch offenen Fragen. Sowohl für die „endocrine disruptors“ als auch für die Arzneistoffe besteht trotz der ständig steigenden Zahl an Veröffentlichungen noch immer ein großes Informationsdefizit bezüglich ihrer Verbreitung in der Umwelt und der möglichen Auswirkungen. Ohne flächendeckendere Bestimmungen der vorliegenden Umweltkonzentrationen und weitergehende Untersuchungen zur biologischen Relevanz der vorgefundenen Konzentrationen ist eine realistische Abschätzung der Umweltgefahren nicht möglich. Die analytische Aufgabe besteht daher darin, Methoden mit der erforderlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu entwickeln, um diese Stoffe in den verschiedenen Umweltkompartimenten identifizieren und quantifizieren zu können.

Als Analyte für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die natürlichen Estrogene Estron, β -Estradiol und Estriol, sowie das synthetische Hormon 17 α -Ethinylestradiol ausgewählt. Sie zählen zur Gruppe der „endocrine disruptors“ und haben aufgrund ihrer starken Hormonwirkung vermutlich einen entscheidenden Anteil an den beobachteten Umweltstörungen. Abgesehen vom Estron werden sie auch als Arzneistoffe eingesetzt. In der Umwelt konnten sie bisher in Konzentrationen im unteren ppt- bzw. ng/l-Bereich nachgewiesen werden [STUMPF, 1996], [KUCH, 2000], [WEGENER, 1999], [SPENGLER, 1999], [DESBROW, 1998]. Als Standardmethode zur Analytik der Estrogene wird üblicherweise eine Probenanreicherung über Festphasenextraktion mit anschließender Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion durchgeführt. Das Ziel der Arbeit bestand darin, alternative Methoden der Probenvorbereitung und Analytik auf ihre Eignung zur spurenanalytischen Bestimmung der Estrogene zu testen. Es sollte z.B. der Einsatz einer HPLC-Methode erprobt werden, da der apparative Aufwand wesentlich niedriger als für eine Gaschromatographie ist, durch Einsatz einer elektrochemischen Detektion aber dennoch vergleichbare Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wie mit einer massenspektrometrischen Detektion zu erreichen sind. Auf dem Gebiet

der Probenvorbereitung sollten Alternativen aufgezeigt werden, um z.B. eine kostengünstigere Analytik bei dennoch hohem Probendurchsatz zu ermöglichen. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Entwicklung einer Screening-Methode, um eine Vorabauswahl der weiter zu analysierenden Proben treffen zu können.

Da der Haupteintrag der Estrogene in die Umwelt über die Kläranlagen erfolgt, sollte die Methodenentwicklung zunächst von gereinigtem Abwasser (Kläranlagenablauf) ausgehen. Die Konzentrationen sind hier verglichen mit anderen Umweltwässern relativ am höchsten. Da gereinigtes Abwasser eine recht komplexe Probenmatrix darstellt, kann eine für Abwasser entwickelte Methode auch auf geringer belastete Umweltwässer wie Oberflächen- oder Grundwasser übertragen werden. Soll allerdings ungeklärtes Abwasser oder Klärschlamm in die Untersuchungen mit einbezogen werden, so erfordert dies zusätzliche Aufreinigungsschritte, was jedoch nicht mehr Zielstellung der Arbeit war.

Die entwickelten Methoden sollten abschließend für die Messung von Realproben eingesetzt werden.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 UNTERSUCHTE ESTROGENE

2.1.1 VORKOMMEN, WIRKUNG UND VERWENDUNG

Die Estrogene sind chemisch gesehen Steroidhormone und gehören neben den Gestagenen zur Gruppe der weiblichen Sexualhormone. Ihre hauptsächliche Funktion im Organismus besteht in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der weiblichen Geschlechtsmerkmale und der Steuerung der Reproduktionsvorgänge.

Die Biosynthese der natürlichen Estrogene β -Estradiol, Estron und Estriol erfolgt in den Ovarien. Doch werden auch im Gelbkörper und der Plazenta, und in geringer Menge auch in den Nebennieren und Hoden, Estrogene gebildet. Der biologisch bedeutendste und wirksamste Vertreter der Estrogene ist das Estradiol. Estron besitzt verglichen mit diesem nur 1/3 und Estriol sogar nur 1/10 der biologischen Aktivität.

Estron und Estriol entstehen auch als Metabolite im Verlaufe der Biotransformation des Estradiols. In der Leber wird aus Estradiol zunächst Estron gebildet, welches nach Hydroxylierung in Position 16 in Estriol umgewandelt wird. Hydroxylierungen erfolgen auch in den Positionen 2, 4 und 6 des Steroidgerüsts, wobei 6 α - und 6 β -Hydroxyestron sowie 6-Oxoestron und die Catecholestrogene 2- und 4-Hydroxyestron sowie 2-Methoxyestron entstehen. In Phase II der Biotransformation werden diese Metabolite dann zu Glucuroniden oder Sulfatestern konjugiert und anschließend überwiegend mit dem Urin ausgeschieden. Der Hauptmetabolit der Biotransformation ist während der Schwangerschaft das Estriol, wohingegen ansonsten Estron und 2-Hydroxyestron überwiegen [FOTSIS, 1980], [FOTSIS, 1987]. Die tägliche Estrogenausscheidung beträgt bei Frauen je nach Zyklusphase 25-100 $\mu\text{g/d}$. Diese erhöht sich in der Schwangerschaft auf bis zu 30 mg/d. Frauen in der Postmenopause scheiden nur noch ca. 5-10 $\mu\text{g/d}$ an Estrogenen aus. Die Ausscheidung bei Männern beträgt 2-25 $\mu\text{g/d}$ [FORTH, 1996].

Das ebenfalls in die spurenanalytischen Untersuchungen mit einbezogene synthetische Estrogenderivat 17 α -Ethinylestradiol besitzt dagegen aufgrund seiner Ethinylgruppe eine, im Vergleich zum Estradiol, wesentlich höhere oxidative Stabilität. Ethinylestradiol wird daher bis zu 80% als Originalverbindung – allerdings aber auch in konjugierter Form – ausgeschieden [RANNEY, 1977]. Dieser gehemmte Abbau führt dazu, dass Ethinylestradiol wesentlich besser bioverfügbar als die natürlichen Estrogene ist. Es kann in oralen Hormonpräparaten, wie z.B. der Antibabypille, als Estrogenkomponente eingesetzt werden. Estradiol wird dagegen nach Applikation sehr schnell metabolisiert, so dass es therapeutisch, abgesehen von transdermalen Systemen, praktisch nur in Form seiner Derivate

zur Anwendung kommt. Neben dem oral applizierbaren Ethinylestradiol wurden Esterderivate des Estradiols entwickelt (z.B. Estradiolvalerat), die subkutan oder intramuskulär injiziert werden können.

Als Indikationsgebiete zur Behandlung mit Estrogenen sind neben der bereits erwähnten Kontrazeption die Estrogensubstitution, z.B. nach Ovariectomie, sowie die Behandlung klimakterischer Beschwerden und die Osteoporoseprophylaxe zu nennen. Für die lokale Therapie von Erkrankungen im Genitalbereich wird Estriol verwendet. Estron wird dagegen therapeutisch nicht eingesetzt, da es keine Vorteile gegenüber den anderen Estrogenen bietet.

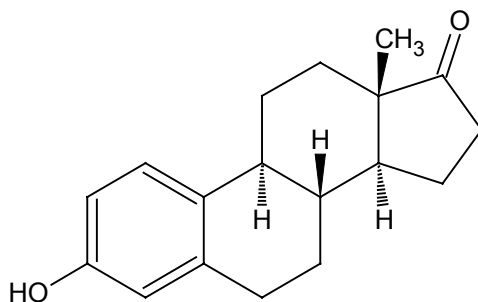
2.1.2 STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN

Estron (E1):

Synonyme:

3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-on (IUPAC)

3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-triene-17-one (WHO)



$C_{18}H_{22}O_2$

$M_r = 270,4$

CAS: 53-16-7

Schmelzpunkt: 251-254 °C (DL-Form), 254,5-256 °C (natürl. D-Form)

[MERCK, 1989]

Löslichkeit: l: Dioxan, Ethanol siedend, Aceton siedend, pflanzliche Öle

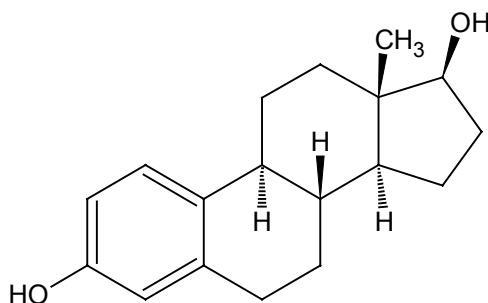
[HAGER, 1993]: sl: Chloroform, Ethanol, best. Alkalihydroxidlösungen

Log K_{ow} [SYRRES]: experimentell: 3,13

berechnet: 3,43

β -Estradiol (E2):

Synonyme: 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol (IUPAC)
Estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol (WHO)



$C_{18}H_{24}O_2$
 $M_r = 272,4$
CAS: 50-28-2

Schmelzpunkt: 173-179 °C

[MERCK, 1989]

Löslichkeit: l: Aceton, Dioxan, Alkalihydroxidlösung

[HAGER, 1993] wl: Ethanol, Ether Chloroform

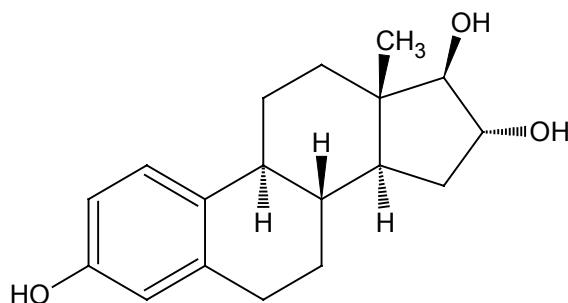
sl: fette Öle

pul: H_2O

Log K_{ow} [SYRRES]: experimentell: 4,01
berechnet: 3,94

Estriol (E3):

Synonyme: 1,3,5(10)-Estratrien-3,16 α ,17 β -triol (IUPAC)
Estra-1,3,5(10)-triene-3,16 α ,17 β -triol (WHO)



$C_{18}H_{24}O_3$
 $M_r = 288,4$
CAS: 50-27-1

Schmelzpunkt: 282 °C

[MERCK, 1989]

Löslichkeit: II: Pyridin, Alkalihydroxidlösung, Pflanzenöle

[HAGER, 1993] I: Ethanol, Aceton, Chloroform, Dioxan, Ether, nicht flüchtige Öle

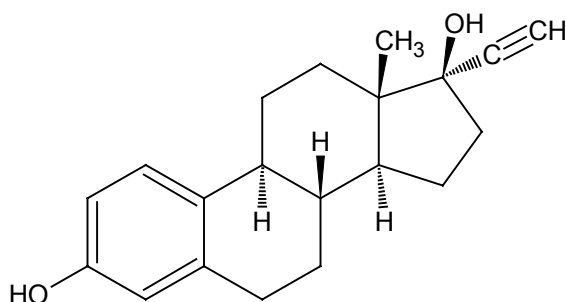
pul: H₂O

Log K_{ow} [SYRRES]: experimentell: 2,45
berechnet: 2,81

17 α -Ethinylestradiol (EE2):

Synonyme: 19-Nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol (IUPAC)

17-Ethynyl-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol (WHO)



C₂₀H₂₄O₂

M_r = 296,4

CAS: 57-63-6

Schmelzpunkt: 182-184 °C

[MERCK, 1989]

Löslichkeit: I: Ethanol, Ether, Aceton, Dioxan, Chloroform, pflanzliche Öle, Alkalihydroxidlösung

[HAGER, 1993] pul: H₂O

Log K_{ow} [SYRRES]: experimentell: 3,67
berechnet: 4,12

2.2 UNTERSUCHUNGSMATRIX ABWASSER

Da der Haupteintrag der Estrogene in die Umwelt über die Kläranlagen erfolgt, sollte die Methodenentwicklung von gereinigtem Abwasser ausgehen. Die Matrixbelastung ist zwar nicht mit der von Rohabwasser zu vergleichen, doch enthält auch gereinigtes Abwasser noch eine Vielzahl gelöster organischer und anorganischer Bestandteile sowie suspendierter Materie.

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Matrixbelastung einer Wasserprobe ist der DOC-Wert. Der DOC ist ein Summenparameter, der die Gesamtmenge an gelöstem organisch gebundenen Kohlenstoff im Wasser angibt. Eine Unterfraktion dieser gelösten Kohlenstoffverbindungen sind die Huminstoffe, deren Anteil 30 bis 80% betragen kann [GREMM, 1993].

Bei den Huminstoffen handelt es sich um Abbauprodukte natürlichen organischen Materials. Die Huminstoffe stellen eine komplexe Mischung hochmolekularer Verbindungen mit variierenden Strukturen und Funktionalitäten dar, deren exakte Zusammensetzung und Struktur weitgehend unbekannt ist. Man unterscheidet jedoch drei Hauptgruppen [HÜTTER, 1994], [SCHWOERBEL, 1993]:

- Fulvinsäuren (Fulvosäuren):
Gehalt an organischem Kohlenstoff: 40-50%, MG: 2.000-9.000, schwach gelblich bis gelbbraun, löslich in Wasser, Säuren und Basen
- Huminsäuren:
Gehalt an organischem Kohlenstoff: 50-60%, MG: 10.000-100.000, braun bis tiefbraun-grauschwarz, löslich in Wasser (teilweise kolloidal) und Basen, Ausfällung mit Säuren bei pH 2
- Humine:
heterogene Verbindungen mit stark unterschiedlichem MG, fast schwarz

Huminstoffe weisen polare und unpolare Bereiche im Molekül auf, so dass sie sowohl mit hydrophilen als auch mit lipophilen Verbindungen in Wechselwirkung treten können. Darüber hinaus sind sie auch in der Lage, Komplexe mit Metallionen einzugehen. Bei den funktionellen Gruppen der Huminstoffe handelt es sich hauptsächlich um Carboxylgruppen ($pK_s \sim 4$) und phenolische Hydroxygruppen ($pK_s \sim 10$) [HÜTTER, 1994].

Wenn Huminstoffe bzw. gelöste organische Kohlenstoffverbindungen während der Probenvorbereitung mit angereichert werden, kann dies zu einem Verlust an Effektivität und Selektivität der Methode führen [JOHNSON, 1991], [GREMM, 1993], [RODRIGUEZ, 2000]. Gerade im Bereich der Spurenanalytik macht sich dies u.U. nachteilig bemerkbar.

Im Folgenden wird der Begriff „Huminstoffe“ synonym für alle im Abwasser gelösten organischen Matrixkomponenten verwendet, obwohl dies formal nicht ganz richtig ist, da die Huminstoffe nur einen mehr oder weniger großen Anteil des DOC darstellen. Eine Differenzierung ist allerdings sehr schwierig und für die behandelte Problemstellung nicht nötig.

Die in der Arbeit dargestellten Untersuchungen erfolgten mit gereinigtem Abwasser des Klärwerks Falkenberg (Berliner Wasserbetriebe). Das Abwasser diente zum einen als Matrix zur Methodenentwicklung, wurde dann aber auch abschließend mit den entwickelten Methoden untersucht. Angaben zum DOC-Gehalt des verwendeten Abwassers liegen nicht vor. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen war eine Bestimmung des DOC-Gehaltes nicht möglich.

2.3 PROBENVORBEREITUNG

Eine Probenvorbereitung beinhaltet neben der Aufkonzentrierung und Abtrennung der Analyte aus der Probenlösung auch die Abtrennung störender Begleitstoffe. Da die zu untersuchenden Abwasserproben zum einen stark matrixbelastet sind und zum anderen nur Analytkonzentrationen im unteren ppt-Bereich (ng/l) zu erwarten sind, ist für die Messungen eine Anreicherung mit entsprechendem Aufreinigungsschritt erforderlich.

Für wässrige Proben kommen in Abhängigkeit der Analyte meist die folgenden Probenvorbereitungstechniken zum Einsatz:

- Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid liquid extraction, LLE)
- Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE)
- Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction, SPME)
- Headspace und Purge-and-Trap

Zur Bestimmung müssen die Analyte oftmals noch in ein anderes Lösemittel überführt und eventuell derivatisiert werden.

Im Folgenden wird hauptsächlich auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Techniken näher eingegangen. Im Idealfall sollte eine Probenvorbereitungsmethode gefunden werden, die es erlaubt, alle vier Estrogene gemeinsam zu bestimmen.

2.3.1 FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (LIQUID-LIQUID-EXTRACTION, LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion stellt praktisch die klassischste Methode der Stofftrennung dar. Das Prinzip beruht auf der Verteilung einer Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen (Nernst'scher Verteilungssatz). Die Methode als solche ist sehr einfach durchzuführen und erfordert keinen großen apparativen Aufwand. Sie wird aber heute aufgrund des großen Lösemittelverbrauchs sowie der damit verbundenen Kosten und der Gefährdung von Mensch und Umwelt immer weniger verwendet. Bis vor einigen Jahren war die LLE noch die Standardmethode zur Probenvorbereitung in der Umweltanalytik, sie wurde in vielen EPA- und DIN-Methoden eingesetzt.

Als eine Verbesserung der LLE ist die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion (micro liquid liquid extraction, MLLE) zu nennen, die mit wesentlich geringeren Mengen an organischen Lösemitteln auskommt. Üblicherweise wird hier zur Extraktion von 1 l Wasser nur ca. 1 ml Lösemittel benötigt. Die Grundvoraussetzung ist aber ein großer bis sehr großer Verteilungskoeffizient des Analyten für das gewählte Lösemittel. Anwendungen der MLLE für umweltanalytische Untersuchungen sind in der Literatur beschrieben [SAMSON, 1996], [ZAPF, 1995].

Eine moderne Abwandlung der LLE stellt auch die Flüssig-Flüssig-Extraktion an Säulen gepackt mit Diatomeenerden dar. Diese Methode wird auch als supported liquid liquid extraction (SLLE) bezeichnet. Die wässrige Probe wird hierzu auf die Säule aufgebracht und verteilt sich dort quasi als stationäre Phase auf der porösen Matrix. Die Extraktion erfolgt dann mit einem organischen Lösemittel, welches beim Durchlaufen der Säule die Analyte eluiert. Die wässrige Phase bleibt dabei auf dem Trägermaterial zurück. Von Vorteil bei dieser Methode ist, dass ein emulsionsfreies Eluat erhalten wird und die Methode im Gegensatz zur LLE leichter zu automatisieren ist.

In Kapitel 3.4 sind die Ergebnisse der im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Flüssig-Flüssig-Extraktion der Estrogene dargestellt.

2.3.2 FESTPHASENEXTRAKTION (SOLID PHASE EXTRACTION, SPE)

Die Entwicklung der Festphasenextraktion geht auf erste Anreicherungsversuche an Aktivkohle zurück. Heute ist sie praktisch die Methode der Wahl und hat die LLE für viele Applikationen bereits verdrängt. Dies ist neben der Entwicklung ständig neuer Anreicherungsphasen auch auf die Einführung von Einmalkartuschen und die einfachen Möglichkeiten der Automatisierung zurückzuführen [LISKA, 2000]. Außerdem bietet die SPE Vorteile bei der Anreicherung polarer Verbindungen, die mittels LLE oftmals nicht er-

fasst werden konnten.

Das Prinzip der Festphasenextraktion beruht auf der Wechselwirkung des Analyten mit einer stationären Phase, dem Sorbens. Als Sorbentien kommen hierbei u.a. Polymere, RP-Phasen und Kohlematerialien zum Einsatz. Die wässrige Lösung wird durch die SPE-Kartusche hindurchgesaugt. Die Analyte gehen dabei mehr oder weniger starke Wechselwirkungen mit dem Sorbens ein und werden entsprechend stark zurückgehalten. Als Trennprinzipien sind die aus der Chromatographie bekannten Mechanismen der Verteilung, der Adsorption, des Ionenaustausches und des Größenausschlusses zu nennen. Der Anreicherung können dann noch Waschschrte folgen, bevor das Sorbens schließlich getrocknet wird und die Analyte mit einem geeigneten Lösemittel eluiert werden. Der Verbrauch an organischen Lösemitteln ist hierbei erheblich niedriger als bei der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion, was auch ein wesentlicher Grund dafür ist, dass die LLE oftmals durch eine SPE ersetzt wurde.

Eine Weiterentwicklung der typischen SPE-Kartuschen stellen die Membrandisks dar. Hierbei handelt es sich um eine Art von Filterscheiben, bei denen die Sorbentien in eine PTFE-Matrix eingearbeitet sind. Der Vorteil besteht darin, dass die Anreicherung hier mit deutlich höheren Flussraten als bei der konventionellen SPE erfolgen kann, und somit auch leicht größere Probenvolumina extrahiert werden können.

In der Umweltanalytik wird die Festphasenextraktion sehr oft eingesetzt, z.B. in der Pestizidanalytik [SABIK, 2000], [WELLS, 2000], [BUTZ, 1994], zur Bestimmung von PAKs [MARCE, 2000] und zur Phenolbestimmung [RODRIGUEZ, 2000], [SCHILLING, 1998]. Auch in Veröffentlichungen zur Analytik von Estrogenen wird meist die SPE zur Probenvorbereitung verwendet [KUCH, 2000], [CROLEY, 2000], [LAGANA, 2000], [SPENGLER, 1999], [STUMPF, 1996], [SCHLETT, 1996].

Die Ergebnisse der SPE-Anreicherungen der Estrogene sind dem Kapitel 3.5 zu entnehmen.

2.3.3 FESTPHASENMIKROEXTRAKTION (SOLID PHASE MICRO EXTRACTION, SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) ist eine relativ neue Methode der Probenvorbereitung, deren Prinzip zum ersten Mal 1989 von Pawliszyn und Belardi veröffentlicht wurde [BELARDI, 1989]. 1990 wurde die erste SPME-Faser in Form einer Mikroliter-spritze entwickelt, was wesentlich zur Vereinfachung der Handhabung beitrug [ARTHUR, 1990]. Von diesem Zeitpunkt an nahm die Zahl der Publikationen zur SPME rasant zu.

Einen Überblick zur Entwicklung und den Einsatzmöglichkeiten der SPME geben Lord und Pawliszyn [LORD, 2000].

Das Prinzip der SPME beruht auf der Anreicherung von Analyten an einer Quarzfaser, die in der Regel mit einem dünnen Polymerfilm beschichtet ist. Man unterscheidet hierbei zwei mögliche Arten der Probenanreicherung. Im Falle der Immersion wird die Faser direkt in die Analysenlösung eingetaucht, wohingegen bei einer Headspace-Anreicherung die Faser in den Gasraum oberhalb der Probe eingebracht wird. Die anschließende Bestimmung der Analyten erfolgt meist chromatographisch. Die Substanzen müssen dazu von der Faser desorbiert werden. Dies kann bei thermisch desorbierbaren Verbindungen direkt im Injektor eines Gaschromatographen erfolgen. Nicht flüchtige oder polare Verbindungen müssen hingegen in einem speziellen Interface mit einem organischen Lösemittel eluiert und anschließend mittels HPLC untersucht werden [CHEN, 1995].

Der prinzipielle Aufbau einer SPME-Faser mit Faserhalter ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

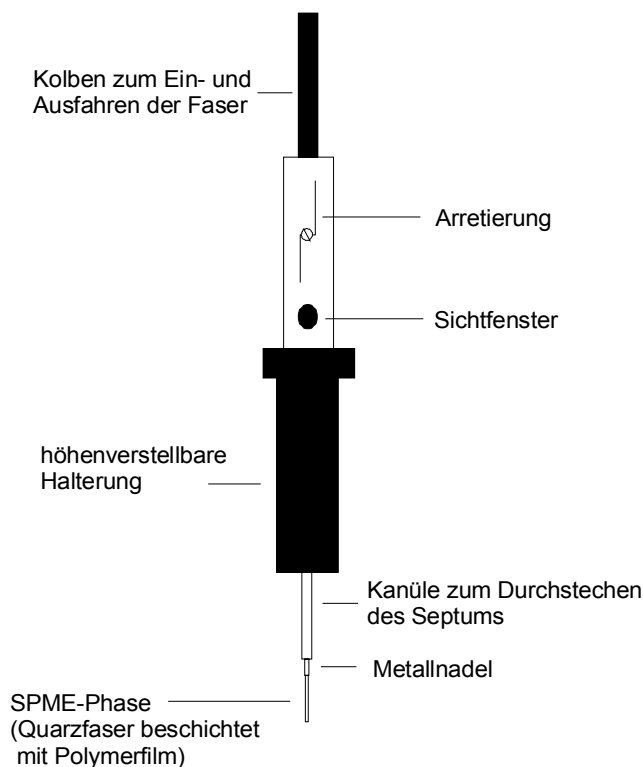


Abbildung 2.1: SPME-Faserhalter mit eingebauter Faser

Die verschiedenen Typen von Faserbeschichtungen werden entsprechend ihres Anreicherungsverhaltens in zwei Gruppen eingeteilt, in Verteilungs- und Adsorptionsphasen. Zu den Verteilungsphasen gehören die Polydimethylsiloxan- und Polyacrylat-Beschich-

tungen. Bei den Adsorptionsphasen sind zusätzlich poröse Partikel in den Polymerfilm eingebettet, so dass es sich eigentlich um Mischphasen handelt. Beispiele hierfür sind Carbowax/Divinylbenzen-, Carboxen/Polydimethylsiloxan- und Divinylbenzen/Carboxen-Fasern. Die genannten SPME-Phasen unterscheiden sich in ihrer Selektivität, was sowohl auf die unterschiedliche Polarität der Polymere bzw. bei den gemischten Phasen auch auf die unterschiedliche Porosität der eingeschlossenen Partikel zurückzuführen ist. Eine Aufstellung kommerziell erhältlicher Fasern ist im experimentellen Teil angegeben (Tabelle 7.4).

In der Literatur sind weitere, speziell von Anwendern entwickelte Phasen beschrieben, die zur Zeit jedoch noch nicht käuflich zu erwerben sind. Eine Nafion-Faser z.B. ermöglicht die Extraktion von polaren Analyten aus unpolaren Matrices [GORECKI, 1998A]. Mit den herkömmlichen SPME-Phasen war es bisher nur möglich, unpolare Analyten aus wässrigen Matrices zu extrahieren. Weiterhin wurden Fasern beschichtet mit Ionenaustauschern beschrieben, die zur Anreicherung von Proteinen [LIAO, 1996] und Metallionen [OTU, 1993] verwendet werden, sowie auch einfache Metalldrähte, auf denen Analyte direkt angereichert [DJOZAN, 2001] oder elektrochemisch abgeschieden werden können [GUO, 1996]. Yuan et al. stellten SPME-Fasern für Immunoaffinitätsuntersuchungen her [YUAN, 2001].

Die in dieser Arbeit fast ausschließlich benutzte Polyacrylat-Phase (PA) wird wie die Polydimethylsiloxan-Phase (PDMS) zu den Verteilungsphasen gerechnet. Polyacrylat liegt bei Raumtemperatur als feste Phase vor, so dass neben Verteilungsvorgängen auch Adsorptionvorgänge theoretisch nicht auszuschließen sind. Die Diffusionskoeffizienten organischer Moleküle sind aber in Polyacrylat noch so groß, dass Moleküle in das Polymer hineindiffundieren können und damit eine Verteilung als Hauptanreicherungsmechanismus angenommen werden kann [GORECKI, 1999]. Im Folgenden soll näher auf die der SPME zugrunde liegende Theorie eingegangen werden:

Betrachtet man den Versuchsaufbau der Festphasenmikroextraktion, so besteht das System aus zwei bzw. drei Phasen: Neben der Faserbeschichtung liegt eine Probenlösung und/oder eine Gasphase vor. Die Anreicherung erfolgt entweder durch direktes Eintauchen der Faser in die Probenlösung (Immersion) oder aus der Gasphase (Headspace) (Abbildung 2.2).

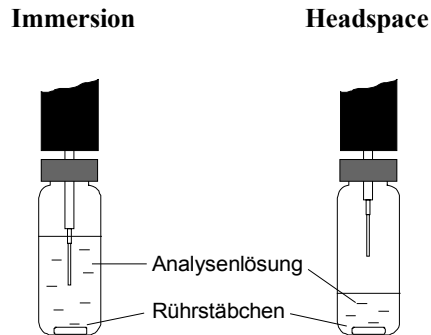


Abbildung 2.2: Immersion und Headspace

Für die Analyte stellen sich zwischen den Phasen Konzentrationsgleichgewichte ein, die nach Nernst über Verteilungskoeffizienten beschrieben werden können [SCHEPPERS WERCINSKI, 1999]. Da die Anreicherungen in der Regel aus verdünnten Lösungen erfolgen, wird hier vereinfacht von Konzentrationen statt von Aktivitäten ausgegangen.

$$K_{fh} = \frac{c_f}{c_h} \quad K_{hs} = \frac{c_h}{c_s} \quad K_{fs} = \frac{c_f}{c_s} \quad (1-3)$$

K_{fh} : Verteilungskoeffizient Faser/Gasphase, K_{hs} : Verteilungskoeffizient Gasphase/Lösung, K_{fs} : Verteilungskoeffizient Faser/Lösung, c_f : Konzentration in der Faser, c_h : Konzentration in der Gasphase, c_s : Konzentration in der Lösung

Für das Ausmaß der Anreicherung eines Stoffes mittels Immersion spielt nur die Verteilung zwischen der Probenlösung und der Faserbeschichtung eine Rolle. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass im Probenvial keine Gasphase vorhanden ist bzw. die Analyte nicht flüchtig sind, und daher nicht in die Gasphase übergehen. Das sich einstellende Verteilungsgleichgewicht zwischen Faser und Lösung wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$K_{fs} = \frac{c_f}{c_s} = \frac{(n_f / V_f)}{c_o - (n_f / V_s)} \quad (4)$$

n_f : an der Faser angereicherte Stoffmenge, V_f : Volumen der Faser, V_s : Volumen der Lösung, c_o : Ausgangskonzentration des Analyten in der wässrigen Probenlösung

Die aus der Probenlösung angereicherte Stoffmenge berechnet sich dann aus K_{fs} durch Auflösen der Gleichung (4) nach n_f [LOUCH, 1992]:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s c_o}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (5)$$

In Abhängigkeit des Analysenvolumens können für die angereicherten Stoffmengen folgende zwei Grenzwerte berechnet werden.

Falls V_s sehr groß ist und damit $V_s \gg K_{fs} V_f$, dann wird n_f praktisch vom Analysenvolumen unabhängig:

$$n_f = K_{fs} V_f c_o \quad (6)$$

Im umgekehrten Fall erreicht man bei sehr kleinem V_s und damit $V_s \ll K_{fs} V_f$ eine praktisch quantitative Anreicherung des Analyten:

$$n_f = V_s c_o \quad (7)$$

Die obigen drei Gleichungen zeigen in jedem Fall den proportionalen Zusammenhang zwischen angereicherter Stoffmenge n_f und vorliegender Analysenkonzentration c_o . Dies stellt die Voraussetzung für quantitative SPME-Bestimmungen dar.

Um den Zusammenhang zwischen angereicherter Stoffmenge und Analysenkonzentration für eine Headspace-Anreicherung zu beschreiben, müssen auch die Verteilungskoeffizienten K_{fh} und K_{hs} berücksichtigt werden. Die angereicherte Stoffmenge n_f ergibt sich aus der folgenden Beziehung:

$$n_f = \frac{K_{fs} K_{hs} V_f c_o V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (8)$$

V_h : Volumen der Gasphase

Da im Rahmen der Arbeit die Anreicherung ausschließlich mittels Immersion erfolgte, soll auf eine genauere Betrachtung der Theorie bei einer Headspace-Anreicherung verzichtet werden [ZHANG, 1993].

Obwohl die Festphasenmikroextraktion noch eine relativ junge Methode der Probenvorbereitung ist, wird sie schon in vielen analytischen Bereichen erfolgreich für qualitative und quantitative Untersuchungen verwendet. Im Bereich der Umweltanalytik wird die SPME sehr vielseitig eingesetzt, z.B. zur Analytik von VOCs [SANTOS, 1996], [JAMES, 1997], Pestiziden [BELTRAN, 2000], [LAMBROPOULOU, 2000], [HENRIKSEN, 2001], Phenolen [BUCHHOLZ, 1994], [MÖDER, 1997] und PAKs [CHEN, 1995]. Je nach

Fragestellung kann es sich dann um die Untersuchung von Luft-, Wasser- oder Bodenproben handeln. Auch aus der Lebensmittelanalytik erschienen diverse Publikationen zur SPME [BELTRAN, 2000], [ZAMBONIN, 2001]. Ein großer Teil stammt hier aus dem Gebiet der Aromastoffanalytik [YANG, 1994], [PAGE, 2000], [AUGUSTO, 2000]. Ebenso können auch biologische Matrices wie Blut oder Urin mittels SPME analysiert werden [SNOW, 2000]. Oftmals handelt es sich hier um Untersuchungen aus dem forensisch-toxikologischen Bereich [YASHIKI, 1995], [FUCCI, 2001], [STAERK, 2000].

Da mittels SPME in Abhängigkeit von Substanzklasse und Matrix durchaus Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im ppb- und ppt-Bereich erreicht werden können [BUCHHOLZ, 1994], [BELTRAN, 2000], sollte die Eignung der Methode zur spurenanalytischen Bestimmung der Estrogene im Abwasser geprüft werden.

Zur SPME-Analytik von Arzneistoffen in der Umwelt erschienen bislang nur wenige Publikationen. Huppert et al. beschrieben den Nachweis des Weichmachers N-Butylbenzolsulfonamid und des Arzneistoffes Ibuprofen aus geklärtem und ungeklärtem Abwasser [HUPPERT, 1998]. Moeder et al. weiteten das Spektrum der untersuchten Stoffe auf weitere Schmerzmittel und Betablocker, sowie einige andere, in der Umwelt zu erwartende Verbindungen, aus [MOEDER, 2000], und Werres et al. gelang die Analytik verschiedener acider Antirheumatika und Lipidsenker [WERRES, 2000]. Die Bestimmung von Phenolen mit endokriner Wirkung aus Umweltwässern mittels SPME wird in einer Arbeit von Helaleh et al. beschrieben [HELALEH, 2001].

Veröffentlichungen speziell zum Einsatz der SPME für die Estrogenanalytik gibt es derzeit nur sehr wenige. Okeyo et al. entwickelten eine Methode zur Bestimmung von Estrogenen und anabolen Steroiden aus Humanserum [OKEYO, 1997], [OKEYO, 1998] und Penalver et al. erprobten den Einsatz der SPME-HPLC zur Messung von estrogenen Verbindungen in Umweltproben [PENALVER, 2002]. Gerade im Bereich der Umweltanalytik erfolgt die Estrogenbestimmung in der Regel noch mittels konventioneller Festphasenextraktion.

In Kapitel 3.6 wird eine SPME-GC-Methode zur Bestimmung der Estrogene vorgestellt.

2.3.4 WEITERE METHODEN DER PROBENVORBEREITUNG

Neben LLE, SPE und SPME sind weitere, ebenfalls gängige Probenvorbereitungstechniken zu nennen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingesetzt wurden, da sie teilweise eher speziell auf bestimmte Analyteigenschaften und Probenmatrices ausgelegt sind.

- Eindampfen, Gefriertrocknen oder Ausfrieren der Probenlösung:
Die Probenlösung wird mit diesen Techniken direkt eingeeengt. Begleitstoffe können so allerdings nicht abgetrennt werden, d.h. bei stärker matrixbelasteten Proben ist ein zusätzlicher Reinigungsschritt unumgänglich.
- Headspace und Purge-and-Trap:
Beide Techniken eignen sich nur für die Bestimmung flüchtiger Analyte. Diese werden aus der Probenmatrix in die Gasphase ausgetrieben und anschließend analysiert. Der entscheidende Vorteil der beiden Verfahren liegt in einer sehr effektiven Abtrennung aller nicht flüchtigen Begleitstoffe.
- Soxhlet-Extraktion:
Das Soxhlet-Verfahren stellt ein kontinuierlich arbeitendes Extraktionsverfahren dar, das für feste und flüssige Proben einsetzbar ist. Oftmals wird es zur Aufarbeitung komplexer Matrices, wie z.B. von Bodenproben eingesetzt.
- Supercritical fluid extraction (SFE):
Die SFE (z.B. mit überkritischem Kohlendioxid) wird ebenfalls zur Extraktion komplexer Proben verwendet. Ein wesentlicher Vorzug der Methode liegt in den guten Löseeigenschaften der überkritischen Flüssigkeiten für organische Verbindungen, von Nachteil ist jedoch der große apparative Aufwand.

2.3.5 DERIVATISIERUNG

Auch die Derivatisierung ist als zusätzlicher Reaktionsschritt vor der eigentlichen Bestimmung des Analyten dem Kapitel Probenvorbereitung zuzuordnen. Unter einer Derivatisierung versteht man die Überführung eines Analyten in einen ihm verwandten Abkömmling. Die Veränderungen erfolgen dabei in der Regel durch Reaktionen an den funktionellen Gruppen der Moleküle.

Aus analytischer Sicht sind als Gründe für eine Derivatisierung zu nennen, dass

- die Verbindung in ihrer ursprünglichen Struktur nicht analytisch bestimmbar ist, z.B. für die GC erst in eine flüchtigere Verbindung überführt werden muss
oder
- die Bestimmung in Bezug auf Selektivität, Empfindlichkeit und/oder Nachweis- und Bestimmungsgrenze verbessert werden soll.

Eine Derivatisierung kann prinzipiell in einem separaten Probenvorbereitungsschritt oder aber „online“ erfolgen. Es ist jedoch entscheidend, dass der Umsetzung eine definierte

stöchiometrische Reaktion zugrunde liegt und diese reproduzierbar abläuft.

Da im Rahmen dieser Arbeit Derivatisierungsreaktionen für die gaschromatographische Bestimmung der Estrogene genutzt wurden, soll im Folgenden kurz auf die Gründe und Möglichkeiten der Derivatisierung für die GC eingegangen werden. Für weitere Ausführungen zur Derivatisierung, zu Applikationen, sowie auch zu Derivatisierungsreaktionen für andere analytische Methoden, sei auf die Handbücher von D.R. Knapp und K. Blau/J.M. Halket verwiesen [KNAPP, 1979], [BLAU, 1993].

2.3.5.1 Derivatisierung für die Gaschromatographie

Die Grundvoraussetzung für eine gaschromatographischen Bestimmung ist, dass der Analyt entweder gasförmig vorliegt oder zumindest verdampfbar ist. Probleme ergeben sich daraus für polare Verbindungen, die aufgrund inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen meist sehr hohe Siedepunkte haben. Zu diesen polaren Verbindungen gehören z.B. Substanzen mit alkoholischen oder phenolischen Hydroxygruppen, Aminogruppen, Säurefunktionen usw.. Diese müssen durch entsprechende Derivatisierungsreaktionen in unpolare und damit auch flüchtigere Verbindungen überführt werden.

Für eine GC-Bestimmung müssen die Analyte thermisch stabil sein, da die Probenaufgabe in der Regel über einen heißen Injektor erfolgt. Durch eine Derivatisierungsreaktion besteht die Möglichkeit, die thermische Stabilität der Verbindungen zu erhöhen. Ist dies nicht möglich oder eine Derivatisierung nicht erwünscht, so bietet sich als Alternative die schonendere Probenaufgabe über ein Kaltaufgabesystem (KAS) an.

Folgende chemische Umsetzungen kommen als Derivatisierungsreaktionen für eine gaschromatographische Bestimmung in Betracht:

- **Acylierungen**
für Alkohole, Phenole, Glykole, Amine, Thiole, Sulfonsäuren, Säureamide, Sulfonamide und ungesättigte Verbindungen
- **Alkylierungen**
für Carbonsäuren, Alkohole und Phenole, Alkene, Amine, Thiole, Sulfonsäuren, Säureamide, Sulfonamide, Metalle und Metallspezies
- **Silylierungen**
für alle funktionellen Gruppen mit acidem Wasserstoffatom; auch Ketogruppen können unter Enolisierung reagieren

- Kondensationsreaktion (Veresterungen, Bildung von Schiffsbasen, Oximen...) z.B. Veresterungen von Carbonsäuren mit Alkoholen oder Umsetzungen von Carbonylverbindungen mit Aminen, Hydroxylaminen oder Hydrazinen
- Zyklisierungen für Verbindungen mit mindestens zwei funktionellen Gruppen, wie z.B. Aminosäuren, Ketosäuren, Diolen und Hydroxylaminen, die nach Zugabe eines speziellen Reagenzes unter Ringschluss reagieren

2.3.5.2 Derivatisierung zur Verbesserung von Selektivität, Empfindlichkeit und/oder Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Ein weiterer Grund für den Einsatz einer Derivatisierungsreaktion besteht in der Möglichkeit, die analytische Methode zu verbessern.

Im Gaschromatogramm zeigen z.B. Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen unsymmetrische, tailende Peaks, was meist auf Adsorptionseffekte zurückzuführen ist. Die Folge ist eine schlechte Auflösung und Selektivität, sowie eine Verschlechterung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode.

Derivatisierungsreaktionen werden auch zur Trennung von Isomeren oder anderen chemisch ähnlichen Verbindungen eingesetzt. Eine Derivatisierung bewirkt immer eine Veränderung der Retentionszeiten, was dann eine Trennung von anderen Probenkomponenten ermöglichen kann, und somit die Selektivität der Chromatographie verbessert.

Ein weiteres Ziel der Derivatisierung besteht in einer Verbesserung der Detektierbarkeit. Durch das Einfügen von Halogensubstituenten in ein Molekül kann z.B. bei Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (ECD) oder eines Massenspektrometers mit negativer chemischer Ionisation (MS-NCI) die Nachweis- und Bestimmungsgrenze deutlich verbessert werden. Aber auch bei Einsatz der Elektronen-Ionisation (EI) kann die Darstellung von Derivaten die MS-Bestimmung verbessern. Die Derivate können stabiler als ihre Ausgangsverbindungen sein, fragmentieren damit weniger stark, was zu einer geringeren Zahl an unterschiedlichen Bruchstücken führt. Diese weisen meist eine höhere Intensität auf, was eine bessere Empfindlichkeit und damit auch eine niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode zur Folge hat.

Ein Zugewinn an Selektivität besteht auch darin, dass allgemein nach einer Derivatisierung Fragmente höherer Massen entstehen. Bei Auswertungen im niedrigen Massenbereich treten oftmals Störungen durch Fragmentationen gleicher Masse von Matrixbestandteilen und Verunreinigungen auf („chemisches Rauschen“) [BLAU, 1993]. Eine

andere Möglichkeit, solche Hintergrund-Störungen zu umgehen, bestünde auch in der Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers (HRMS). Dieses ermöglicht auch im niedrigen Massenbereich aufgrund einer sehr exakten Bestimmung der m/z -Werte eine Unterscheidung zwischen Analyt und Interferenz.

Derivatisierungsreaktionen können aber auch einen negativen Einfluss auf die Analytik haben. Überschüssiges Derivatisierungsreagenz kann z.B. die Trennung stören, ebenso wie Verunreinigungen aus den Reagenzien oder Nebenprodukte, die bei der Umsetzung entstehen.

2.3.5.3 Möglichkeiten der Derivatisierung der Estrogene

Die zu untersuchenden Estrogene (E1, E2, EE2 und E3) weisen als polare Funktionen im Molekül phenolische und alkoholische Hydroxygruppen auf. Estron besitzt zusätzlich noch eine Carbonylgruppe. Als mögliche Derivatisierungsreaktionen sind daher für die OH-Gruppen die Alkylierung, Acylierung oder Silylierung und für die Carbonylgruppe die Silylierung oder Oximbildung zu nennen. Auf eine Umsetzung der Carbonylgruppe kann u.U. vollständig verzichtet werden, falls dies keinen negativen Einfluss auf die Chromatographie des Estrons hat.

In der Literatur wird zur Derivatisierung der Estrogene meist die Silylierung eingesetzt [KUCH, 2000], [WEGENER, 1999], [HOLTEY-WEBER, 1999A], [SCHLETT, 1996], [STUMPF, 1996]; bei einer Detektion durch MS mit NCI auch eine Acylierung mit fluorierten Säureanhydriden [CROLEY, 2000].

Die Auswahl der Derivatisierungsmethode für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Messungen ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

2.4 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYTIK

Für spurenanalytische Untersuchungen von Umweltproben eignen sich besonders chromatographische Verfahren, da der qualitativen und quantitativen Bestimmung der Analyte so noch ein Trennschritt vorgeschaltet ist. Hierdurch können mehrere Analyte in einem Analysenlauf bestimmt und eventuell noch vorhandene Matrixbestandteile während der Chromatographie abgetrennt werden. Die verwendete Detektion sollte für die Analyte möglichst selektiv sein, um falsch positive oder negative Ergebnisse ausschließen zu können. Außerdem sollte sie eine hohe Empfindlichkeit und niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermöglichen. Da die in der Umwelt bisher gemessenen Estrogenkonzentrationen im ppt- bzw. ng/l-Bereich lagen (siehe auch Tab.1.1), sollte die für die Spurenanalytik der Estrogene entwickelte Methode diesen Konzentrationsbereich einschließen. Die Bestimmungsgrenze der Methode inklusive aller Probenvorbereitungsschritte sollte bei ca. 1 ng/l liegen.

Für Untersuchungen, die routinemäßig mit entsprechend hohem Probendurchsatz erfolgen, ist es außerdem sinnvoll, eine Screening-Methode zu etablieren. Diese sollte zunächst eine Vorauswahl der Proben ermöglichen, so dass nur Proben, die die Zielanalyte sicher enthalten auch weiter aufgearbeitet und schließlich quantitativ bestimmt werden. Im Rahmen der Arbeit wurde der Einsatz voltammetrischer Methoden zum Screening auf Estrogene getestet.

2.4.1 VOLTAMMETRIE

Voltammetrische Verfahren werden zur Bestimmung elektrochemisch reduzierbarer bzw. oxidierbarer Substanzen eingesetzt. In Abhängigkeit der Analyteigenschaften, des gemessenen Potentialbereichs und der Zusammensetzung der Analysenlösung werden unterschiedliche Elektrodenmaterialien verwendet. Dies können z.B. Quecksilber, Gold, Platin oder auch verschiedene Kohlenstoffmaterialien wie Glaskohlenstoff (Glassy Carbon) oder Kohlepaste sein. Wird die Quecksilberelektrode in Form der Tropfelektrode betrieben, so bezeichnet man diese spezielle voltammetrische Methode als Polarographie. Um eine möglichst gute Empfindlichkeit und Bestimmungsgrenze zu erzielen, werden voltammetrische Bestimmungen meist im Puls- oder Stripping-Verfahren durchgeführt.

Für Bestimmungen im Spurenbereich eignen sich besonders Stripping-Verfahren (inverse Voltammetrie), wobei der eigentlichen Bestimmung des Analyten zunächst noch ein Anreicherungs-schritt vorausgeht. Die Anreicherung erfolgt in der Regel durch elektrolitische Abscheidung des Analyten am hängenden Quecksilbertropfen. Als ein Beispiel für diese Messmethode ist die Bestimmung von Metallkationen an einer Quecksilber-

elektrode zu nennen. Durch reduktive Abscheidung bildet sich zunächst ein Amalgam, das im anschließenden Stripping-Schritt elektrochemisch wieder aufgelöst und bestimmt wird („anodic stripping“).

Ein solches Stripping-Verfahren sollte nun für die Analytik der Estrogene entwickelt werden. Im Sinne einer Screening-Methode sollte damit eine Testung auf estrogene Substanzen direkt aus Abwasserproben ohne vorhergehende Probenvorbereitung und chromatographische Trennung möglich sein.

2.4.1.1 Adsorption an Kohlenstoffelektroden

Aufgrund ihrer phenolischen Hydroxygruppe sind die ausgewählten Estrogene elektrochemisch oxidierbar. Ihr Oxidationspotential an Glassy Carbon liegt bei 800 mV gegen Ag/AgCl/3M KCl. Mittels differentieller Pulspolarographie (DPP) können jedoch nur Konzentrationen bis in den ppm-Bereich (mg/l) vermessen werden, was für die in den Umweltproben zu erwartenden Konzentrationen allerdings nicht ausreicht. Um die Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu senken, wurde versucht, ein Stripping-Verfahren zu etablieren.

Die Estrogene sind jedoch – abgesehen vom Ethinylestradiol – einer klassischen inversen Voltammetrie durch Abscheidung an Quecksilber nicht zugänglich. Da bei einem Stripping-Verfahren der Anreicherungsschritt aber nicht zwingenderweise elektrolytisch erfolgen muss, wäre auch eine adsorptive Anreicherung, z.B. an einer Kohlenstoffelektrode (Graphit oder Kohlepaste), denkbar. Die anschließende Bestimmung der Estrogene würde dann entsprechend der DPP oxidativ erfolgen. Als problematisch bei dieser Vorgehensweise ist allerdings die Selektivität einzuschätzen. Das Oxidationspotential der Estrogene liegt mit 800 mV genau in dem Bereich, in dem allgemein phenolische Verbindungen oxidiert werden. Da in den Umweltproben auch Huminstoffe mit phenolischen Strukturelementen und mit großer Wahrscheinlichkeit auch eine Vielzahl weiterer phenolischer Verbindungen vorliegen, wäre mit dieser Methode eine Differenzierung zwischen Estrogenen und Begleitstoffen praktisch nicht möglich.

2.4.1.2 Cathodic Stripping an Quecksilber

Eine selektivere Anreicherung ist aber für das Ethinylestradiol realisierbar. EE2 kann aufgrund seiner Ethinylgruppe, ebenso wie einige Anionen (z.B. Halogenide, Sulfide, Cyanide) und auch organische SH-Verbindungen, durch ein Stripping an Quecksilber bestimmt werden [BOND, 1982], [BOND, 1984]. Die Anreicherung des EE2 erfolgt dabei

unter Oxidation des Quecksilbers und Bildung eines schwerlöslichen Acetylids [MÜLLER, 1961]. Zur Bestimmung wird das Quecksilber dann wieder reduziert („cathodic stripping“). Ethinylestradiol wird hier also nicht selbst elektrochemisch umgesetzt, die Umsetzung erfolgt vielmehr indirekt über die Oxidation und Reduktion des Elektrodenmaterials.

Die mittels Cathodic Stripping erzielten Messergebnisse sind in Kapitel 3.1.2 dargestellt.

2.4.2 CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN

Aufgrund der Struktur der Estrogene (relativ hohe Molmassen und bis zu drei polare, funktionelle Gruppen im Molekül) bietet sich als chromatographische Bestimmungsmethode eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an. Die Detektion erfolgte im Rahmen der Arbeit UV-photometrisch oder elektrochemisch. Eine LC/MS-Kopplung stand für die Untersuchungen nicht zur Verfügung.

In Veröffentlichungen zur Spurenanalytik von Estrogenen in der Umwelt erfolgt die Bestimmung meist standardmäßig mittels GC/MS oder GC/MS/MS [KUCH, 2000], [TERNES, 1999], [WEGENER, 1999], [SCHLETT, 1996], [STUMPF, 1996]. Als Vergleichsmethode sollte daher eine GC-Methode entwickelt werden. Diese sollte ebenfalls für die SPME-Anreicherungen eingesetzt werden können. Als Detektoren wurden der Flammenionisationsdetektor (FID) sowie die Massenspektrometrie (MS) verwendet.

Auf eine Beschreibung chromatographischer Trennprinzipien und Methoden soll hier verzichtet werden. Soweit für die Methodenentwicklung von Bedeutung wird in Kapitel 3.2 und 3.3 auf die verwendeten Detektionstechniken kurz eingegangen.

Die Leistungsfähigkeit der eingesetzten chromatographischen Verfahren in Kombination mit einer entsprechenden Probenvorbereitung sollte eine Bestimmung der Estrogene bis zu einer Konzentration von 1 ng/l ermöglichen. Unter den im Rahmen der Arbeit gewählten Bedingungen für die Probenvorbereitung (siehe Arbeitsvorschriften im experimentellen Teil) würde dies zu bestimmende Konzentrationen von 1 ng/1 ml für die HPLC respektive 1 ng/50 µl für die GC ergeben. Mit einem Injektionsvolumen von 10 µl für die HPLC bedeutet dies, dass die Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode selbst 10 pg/10 µl betragen müsste. Geht man für die GC von einem Injektionsvolumen von 1 µl aus, so ist hier eine Bestimmungsgrenze von 20 pg/1 µl erforderlich.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 VOLTAMMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.1.1 ADSORPTION AN KOHLENSTOFFELEKTRODEN

In Vorversuchen wurde die adsorptive Anreicherung und anschließende oxidative Bestimmung der Estrogene an verschiedenen Kohlenstoffelektroden erprobt.

Ohne vorherigen Trennschritt war jedoch keine ausreichende Selektivität bezüglich der Unterscheidung zwischen Estrogenen und anderen phenolischen Verbindungen gegeben. Das Verfahren stellte somit nur eine Screening-Methode für Phenole dar und wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht.

3.1.2 CATHODIC STRIPPING AN QUECKSILBER

Die Cathodic Stripping-Bestimmung des Ethinylestradiols erfolgte in Anlehnung an zwei Veröffentlichungen von Bond et al. [BOND, 1982], [BOND, 1984]. Die verwendeten Geräte und Versuchsbedingungen sind dem experimentellen Teil zu entnehmen (7.1.2.1 und 7.2).

Um das Anreicherungs- und Stripping-Potential von EE2 zu ermitteln, wurden cyclische Voltammogramme aus einem alkalischen Boratpuffer-Methanol-Gemisch als Grundelektrolyt aufgenommen. Der gescannte Potentialbereich reichte von -600 bis -100 mV gegen Ag/AgCl/3M KCl, die Scanrate betrug 100 mV/s.

Die Cyclovoltammogramme zeigten einen Oxidationspeak bei -240 mV, der der Oxidation des Quecksilbers unter Bildung des Acetylids zugeordnet wurde. Der zugehörige Reduktionspeak lag bei -300 mV. Als Anreicherungspotential wurde daher -150 mV gewählt. Die anschließende reduktive Bestimmung erfolgte im Bereich von -150 bis -600 mV.

Abbildung 3.1 auf der folgenden Seite zeigt Stripping-Voltammogramme, wie sie nach Anreicherung von Lösungen im Konzentrationsbereich von 12-60 µg/l (ppb) über 60 s erhalten wurden.

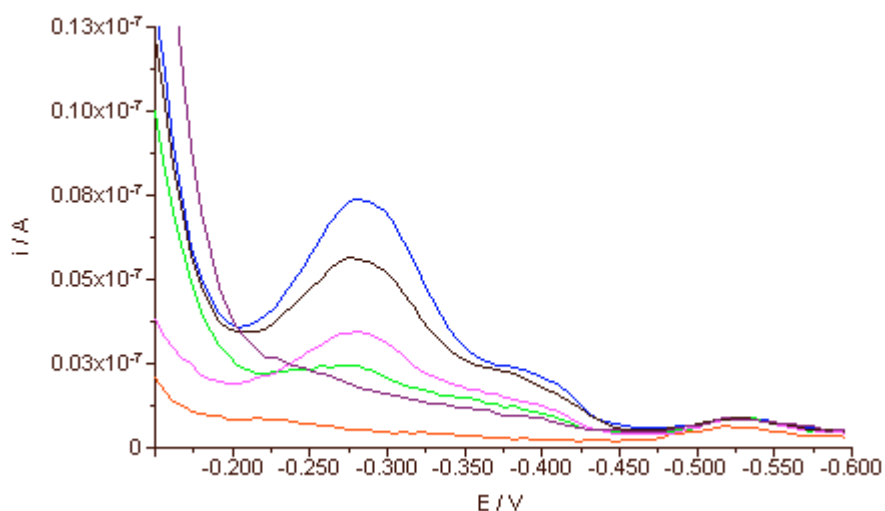


Abbildung 3.1: Stripping-Voltammogramme

Anreicherung: -150 mV für 60 s; Stripping: -150 bis -600 mV

Kurvenzuordnung von unten nach oben bei -300 mV: Grundstrom, 12 µg/l, 24 µg/l, 36 µg/l, 48 µg/l, 60 µg/l

Um zu überprüfen, ob die Methode sich auch für eine quantitative Bestimmung eignet, wurde eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 24-72 µg/l durchgeführt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde die Anreicherungszeit auf 150 s erhöht. Die zugehörigen Wertetabellen sind im Anhang 8.1.1 angegeben.

EE2

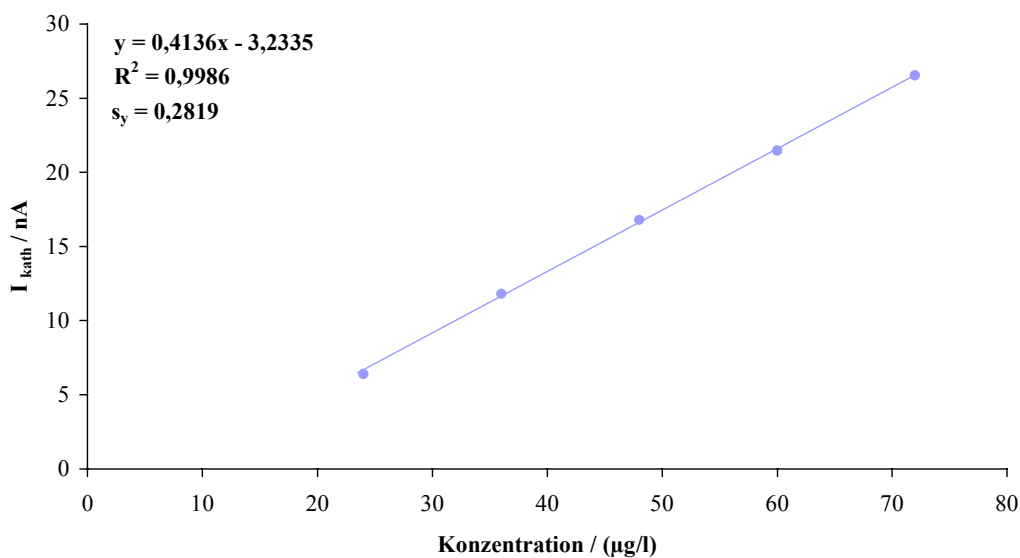


Abbildung 3.2: Kalibrierung für Ethinylestradiol nach Cathodic Stripping, 24-72 µg/l

Anreicherung: -150 mV, 150 s; Stripping: -150 bis -600 mV (Mittelwerte aus n=4)

Die Kalibrierkurve zeigt eine lineare Abhängigkeit im vermessenen Konzentrationsbereich. Die Bestimmungsgrenze der Methode ist hier aber praktisch mit $24 \mu\text{g/l}$ schon erreicht, was für die im Abwasser zu erwartenden Konzentrationen im unteren ppt-Bereich (ng/l) nicht ausreichend ist.

Ausgehend von niedriger konzentrierten Lösungen wurden daher Messungen mit längeren Anreicherungszeiten durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt Voltammogramme nach Anreicherung einer Lösung der Konzentration $1,2 \mu\text{g/l}$ über verschieden lange Zeiträume.

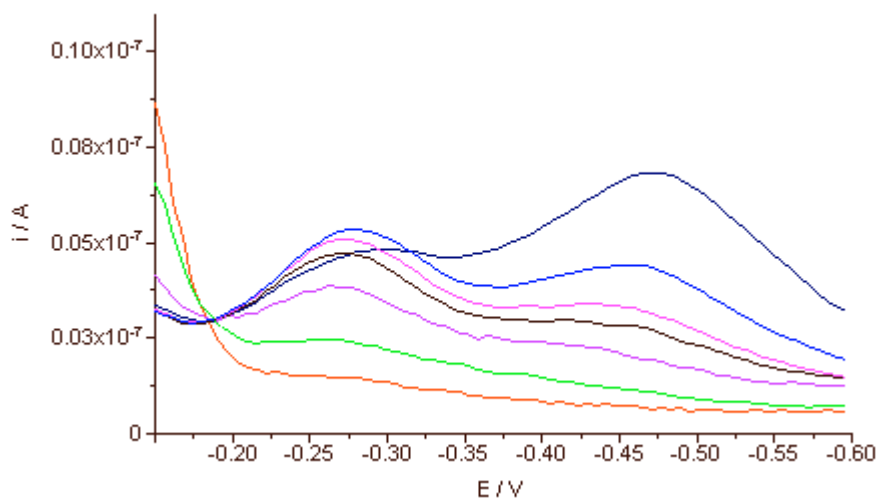


Abbildung 3.3: Anreicherung von $1,2 \mu\text{g/l}$ EE2 mit variabler Anreicherungszeit

Anreicherung: -150 mV , Zeit variabel; Stripping: -150 bis -600 mV

Kurvenzuordnung von unten nach oben bei -450 mV : Grundstrom; 300 s, 600 s, 900 s, 1200 s, 1800 s, 3600 s

Mit steigender Anreicherungszeit ist deutlich ein zweiter Peak bei ca. -480 mV zu erkennen, der sich auch bereits in Abb. 3.1 als kleine Schulter abzeichnete. Dieser zweite Peak hat zur Folge, dass die Auswertung des Peakstroms von EE2 durch den veränderten Basislinienverlauf erschwert ist. Da bis zu diesem Zeitpunkt nur mit selbsthergestellten Standardlösungen gearbeitet wurde, wurde der Ursprung des zweiten Peaks in den verwendeten Lösemitteln oder Chemikalien vermutet. Der Einsatz von Substanzen anderer Hersteller führte jedoch zu keinem anderen Ergebnis. Bei der beobachteten Änderung des Kurvenverlaufes könnte es sich allerdings auch um eine Potentialverschiebung durch Umorientierung des Analyten an der Elektrodenoberfläche handeln.

Der Vergleich der Voltammogramme zeigt, dass sich die Signalintensität durch die Verlängerung der Anreicherungszeit zwar verbessert hat, doch können die erforderlichen

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im ng/l-Bereich auch so nicht erreicht werden.

Für den Einsatz der Methode zur Messung von Realproben stellt sich außerdem auch wieder die Frage der Selektivität. Ebenso wie bei der Adsorption an Kohle mit anschließender oxidativer Bestimmung können auch hier Begleitstoffe der Probe mit erfasst werden. Das gleiche Reaktionsprinzip – also die Bildung eines Niederschlags nach Oxidation des Elektrodenmaterials – liegt auch der Bestimmung von Anionen wie z.B. Chlorid, Bromid oder Sulfid und organischer SH-Verbindungen zugrunde, mit deren Vorkommen ebenfalls in Abwasserproben zu rechnen ist. Für eine wirklich selektive Bestimmung von EE2 mittels Cathodic Stripping wäre daher eine vorhergehende Abtrennung unumgänglich. Die folgende Abbildung zeigt Voltammogramme, die nach Zugabe von Abwasser zur Probenlösung erhalten wurden.

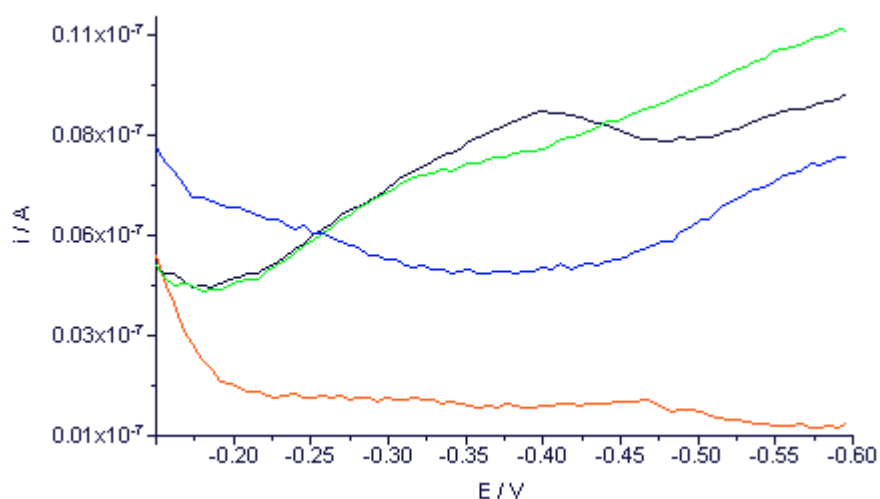


Abbildung 3.4: Zugabe von Abwasser zur Probenmatrix

Anreicherung: -150 mV; Stripping: -150 bis -600 mV

Kurvenzuordnung von unten nach oben bei -400 mV:

Grundstrom Boratpuffer/Wasser (50/50), 150 s

Grundstrom Boratpuffer/Abwasser (50/50), 150 s

Grundstrom Boratpuffer/Abwasser (50/50), 600 s

Boratpuffer/Abwasser (50/50) dotiert mit 12 ppb (µg/l) EE2, 600 s

Am Anstieg des Grundstromes ist zu sehen, dass aus dem Abwasser offensichtlich Verbindungen mit angereichert werden, die im gleichen Potentialbereich wie EE2 reduzierbar sind. Der Vergleich des Stromverlaufs nach Anreicherung einer abwasserhaltigen Grundlösung mit einer entsprechend dotierten Lösung über 600 s zeigt, dass eine Auswertung bis maximal in den unteren µg/l-Bereich möglich wäre.

3.2 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die HPLC-Bestimmung der Estrogene erfolgte als Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase chromatography, RP-Chromatographie) mit elektrochemischer oder UV-Detektion. Als stationäre Phase wurde eine RP18-Säule mit chemisch gebundenem Octadecylsilan verwendet. Dies hatte zwei wesentliche Vorzüge gegenüber einer Normalphasenchromatographie. Zum einen wird für die im Rahmen der Arbeit hauptsächlich verwendete elektrochemische Detektion ein elektrisch leitendes Fließmittel benötigt. Da in der RP-Chromatographie in der Regel mit wässrigen Fließmittelgemischen gearbeitet wird, kann durch entsprechenden Pufferzusatz das Fließmittel leicht auf die benötigte Ionenstärke eingestellt werden. Zum anderen sind die Konditionierungs- und Equilibrierungszeiten an RP-Phasen wesentlich kürzer als an Normalphasen. Dies ermöglicht die Durchführung von Gradientenläufen bzw. auch ein schnelles Spülen der Säule, um eventuell verbliebene Verunreinigungen vor dem nächsten Analysenlauf zu entfernen.

Die verwendeten Geräte und Arbeitsbedingungen sind dem experimentellen Teil zu entnehmen (7.1.2.5). Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte standardmäßig über die Peakflächen, da diese Methode bei unsymmetrischen Peaks bessere Ergebnissen als eine Auswertung über die Höhen liefert. Zu Beginn der HPLC-Untersuchungen wurden die Chromatogramme teilweise allerdings noch über die Höhen ausgewertet, da die Aufzeichnung mittels eines xy-Schreibers erfolgte.

Im Folgenden wird näher auf die Leistungsfähigkeit und Grenzen der eingesetzten Detektionsprinzipien eingegangen.

3.2.1 UV-DETEKTION (UVD)

Die Absorption der Estrogene im UV wird durch die phenolische Struktur in Ring A des Steroidgerüsts dominiert, die weiteren „Substituenten“ tragen nur unwesentlich zur Vergrößerung des chromophoren Systems bei. Dadurch ergibt sich für die Estrogene ein dem Phenol ähnliches UV-Spektrum (siehe Abb. 3.5).

Die Absorptionsmaxima der Estrogene liegen bei 280 nm ($\epsilon \sim 2.300$) und 208 nm ($\epsilon \sim 16.000$) mit einer Schulter bei 220 nm¹. Wählt man zur UV-Detektion (UVD) eine Wellenlänge von 280 nm, so bestimmt man die Estrogene zwar mehr oder weniger selektiv, erreicht aber für eine spurenanalytische Fragestellung nur eine relativ schlechte Bestimmungsgrenze. Bei 208 nm hingegen verbessert sich diese, doch ist hier das Rauschen der Lichtquelle und die Eigenabsorption des Lösemittels bereits deutlich erhöht. Da im

¹ Absorptionskoeffizienten siehe Anhang 8.1.2

Bereich um 200 nm auch eine Vielzahl anderer organischer Verbindungen UV-Licht absorbieren, ist die Selektivität der Methode in diesem Wellenlängenbereich stark eingeschränkt.

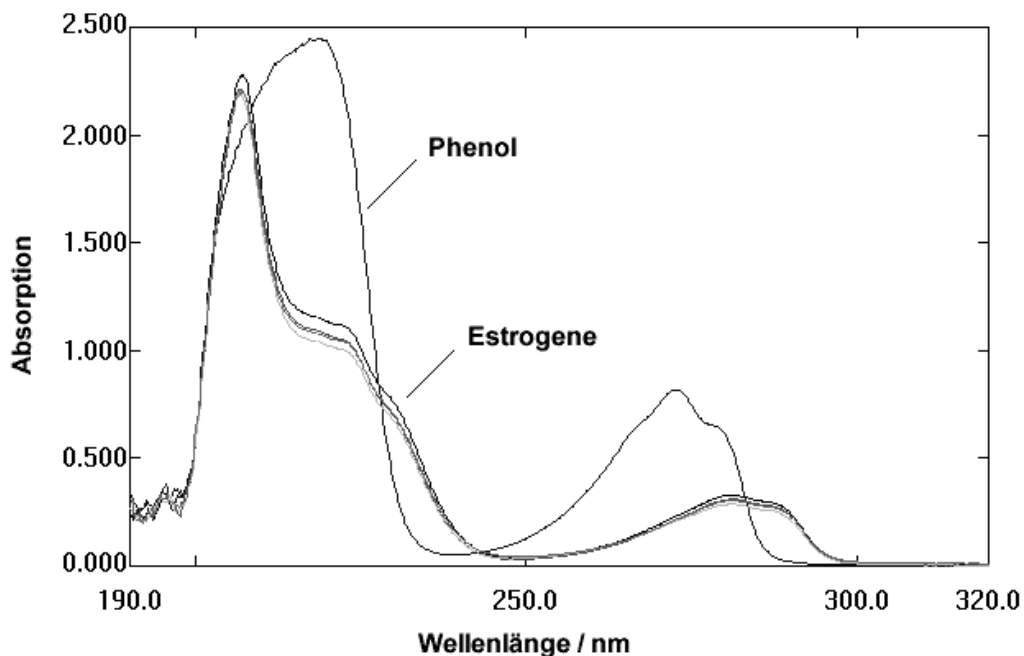


Abbildung 3.5: UV-Spektren (190-320 nm) für die Estrogene (E1, E2, EE2 E3) und Phenol (Konzentration jeweils 0,4 mg/10 ml in Methanol)

Im Hinblick auf die Spurenanalytik ist das vorrangige Ziel zunächst eine niedrige Bestimmungsgrenze. Bei der Messung von Realproben wird man allerdings niemals einen reinen Extrakt des Analyten vorliegen haben, so dass immer mit Störungen durch Matrixbestandteile zu rechnen ist. Die Detektion sollte daher möglichst selektiv sein. Wie aus Abb. 3.5 ersichtlich, ist das Spektrum der Estrogene jedoch wenig charakteristisch, da bei einer Wellenlänge, bei der die Estrogene detektiert werden können, auch andere phenolische Verbindungen mit erfasst werden. Dies kann zu Problemen bei der Messung von Realproben führen, da die im Abwasser vorkommenden Huminstoffe (siehe 2.2) eben auch diese phenolischen Strukturelemente aufweisen. Durch Wahl der Detektionswellenlänge konnte hier praktisch kein Einfluss auf die Selektivität genommen werden, so dass wegen der erzielten höheren Empfindlichkeit und damit auch etwas besseren Bestimmungsgrenze bei 208 nm detektiert wurde.

Ein Vermessen von Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0,5-100 ng/10 µl ergab eine lineare Kalibrierkurve mit Korrelationskoeffizienten zwischen $R=0,9938$ (EE2) und $0,9965$ (E2). Mit dem zunächst verwendeten UV-VIS-Detektor L-4250 von

Merck wurde für die Estrogene eine Bestimmungsgrenze von 2 ng/10 µl erhalten, die bei Einsatz des LCD 500 von GAT aufgrund seiner kleineren Detektorzelle mit längerem optischen Weg auf 0,5 ng/10 µl verbessert werden konnte. Die Bestimmungsgrenzen wurden über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) ermittelt, was nach der ICH eine der möglichen Vorgehensweisen ist. Die Nachweisgrenze (NG) wird hierbei durch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 (oder 2:1) und die Bestimmungsgrenze (BG) durch 10:1 festgelegt [ICH-Q2B, 1996].

Die UV-Detektion wurde für die HPLC-Methodenentwicklung sowie für einen Teil der Optimierungsversuche zur Probenvorbereitung eingesetzt. Ein wesentlicher Vorteil der UVD ist, dass es sich um eine einfach zu handhabende, robuste Detektionsmethode handelt, die sich durch einen großen linearen Bereich auszeichnet und auch für Gradientenbestimmungen geeignet ist. Die geringe Selektivität im unteren UV-Bereich ist für Messungen von Realproben zwar problematisch, für den Einsatz zur Optimierung der Probenvorbereitung aber von Vorteil, da so Störungen durch Matrixkomponenten deutlich aufgezeigt werden. Für spurenanalytische Messungen sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen allerdings nicht ausreichend, da hierfür Konzentrationen im Bereich von 10 pg/10 µl erfassbar sein müssten (siehe 2.4.2).

3.2.2 ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION (ELCD)

Der Begriff der elektrochemischen Detektion (ELCD) wird oftmals synonym mit dem Begriff der amperometrischen Detektion verwendet, obwohl er eigentlich einen Oberbegriff für die verschiedenen elektrochemischen Detektionsprinzipien darstellt. Zu diesen zählen die Konduktometrie, Potentiometrie, Coulometrie, Polarographie und Amperometrie; auch die DK-Metrie wird oftmals mit hinzugerechnet [HENZE, 1986]. Einen allgemeinen Überblick zu elektrochemischen Detektionstechniken in der HPLC findet man bei Stulik [STULIK, 1981].

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff der ELCD ausschließlich für die amperometrische und coulometrische Detektion benutzt. Der Unterschied zwischen beiden Detektionstechniken besteht darin, dass bei einem amperometrischen Detektor der Stoffumsatz in der Zelle etwa 5-10% beträgt, wohingegen in einer coulometrischen Zelle im Idealfall 100% des Analyten elektrochemisch umgesetzt werden.

Da die hier untersuchten Estrogene aufgrund ihrer phenolischen Hydroxygruppe elektrochemisch aktiv sind, können sie mittels ELCD oxidativ bestimmt werden (siehe auch 2.4.1.1).

Als amperometrischer Detektor wurde das ELCD-System der Firma Metrohm mit Wall-Jet-Zelle und einer Arbeitselektrode aus Glassy Carbon [VAN DER LINDEN, 1980] verwendet; als coulometrischer Detektor kam der ESA Coulochem II mit einer Durchflusszelle mit zwei Arbeitselektroden aus porösem Graphit zum Einsatz (Geräte siehe 7.1.2.5). Das Oxidationspotential, d.h. die an der Arbeitselektrode anzulegende Polarisationsspannung, wurde für die Metrohm-Zelle mit 1000 mV gegen Ag/AgCl/3M KCl den Angaben des Herstellers entnommen [METROHM]. Da die ESA-Zelle eine andere Referenzelektrode, und zwar eine Wasserstoff-Palladium-Elektrode, enthält [ESA, A], [MATSON, 1983], wurde das Oxidationspotential hier durch die Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme ermittelt. Laut Herstellerangaben liegen die Polarisationsspannungen bei der Verwendung einer Wasserstoff-Palladium-Elektrode im Vergleich zur Ag/AgCl-Elektrode um ca. 300 mV niedriger.

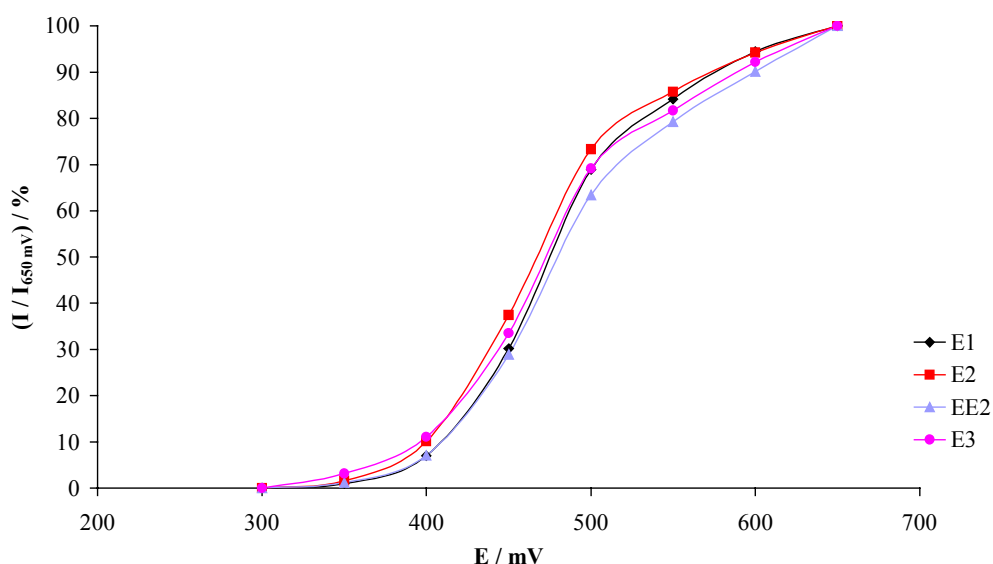


Abbildung 3.6: Hydrodynamische Voltammogramme der Estrogene, HPLC/ESA

Polarisationsspannungen: 300-650 mV (Kanal 2), (I bei 650 mV wurde 100% gesetzt)

Aus den hydrodynamischen Voltammogrammen ist zu ersehen, dass die Messungen vor Erreichen des eigentlichen Oxidationspotentials abgebrochen wurden. Das Oxidationspotential ist erreicht, wenn die gemessene Stromstärke trotz steigender Spannung nicht weiter zunimmt. Aus der Abbildung ist jedoch ersichtlich, dass sich bei 600-650 mV der Beginn dieser Plateauphase bereits abzeichnet, so dass das Oxidationspotential der Estrogene vermutlich bei 700 mV liegt.

Das Oxidationspotential der Zelle wurde bewusst nur im Bereich von 300-650 mV variiert, da nach Auskunft der Firma Bischoff, die ESA-Zellen und -Detektoren in Deutschland vertreiben, die hier verwendete Detektorzelle 5011 nicht über längere Zeit bei Potentialen größer 500 mV betrieben werden sollte. Dies würde ansonsten die Lebensdauer der Elektrode stark verkürzen [BISCHOFF]. Für die im Anschluss durchgeführten ELCD-Messungen wurde eine Polarisationsspannung von 450 mV gewählt, was in etwa dem Halbstufenpotential der hydrodynamischen Voltammogramme entspricht. Diese Wahl stellt einen Kompromiss zwischen maximaler Empfindlichkeit der Messung und Lebensdauer der Detektorzelle dar. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Empfindlichkeit einer elektrochemischen Messung auch stark vom Signal-Rausch-Verhältnis abhängt. Dieses verschlechtert sich mit zunehmender Oxidationsspannung, da verstärkt auch andere Substanzen oxidiert werden. Gleichzeitig sinkt die Selektivität der Bestimmung. Polarisationsspannungen werden daher absichtlich oft nur im Bereich des Wendepunktes des hydrodynamischen Voltammogrammes bzw. etwas darüber gewählt [HENZE, 1986].

Die verwendete 5011er-Zelle besteht wie bereits erwähnt aus zwei Arbeitselektroden, die in Reihe angeordnet sind. Die hydrodynamischen Voltammogramme wurden mit der zweiten Elektrode aufgenommen. Da in den Voltammogrammen unterhalb von 300 mV noch keine Oxidation der Estrogene erfolgte, konnte für die folgenden Messungen das Potential der ersten Elektrode auf 250 mV gesetzt werden. Bestandteile der Probe, die bereits bei diesem Potential umzusetzen sind, werden so vor der eigentlichen Bestimmung der Estrogene oxidiert.

Die HPLC-Messungen der Estrogene erfolgten sowohl mit amperometrischer als auch mit coulometrischer Detektion. Die Messungen mit dem amperometrischen Detektor der Firma Metrohm ließen hierbei aber bereits nach wenigen Injektionen einen deutlichen Empfindlichkeitsverlust erkennen. Die Ursache dafür lag wahrscheinlich in einer Passivierung der Elektrodenoberfläche durch Ablagerung von Reaktionsprodukten, da nach Polieren der Elektrode die ursprüngliche Signalintensität wieder hergestellt werden konnte. Eine solche Reinigung hat jedoch zur Folge, dass das System vor der nächsten Messung zunächst wieder über mehrere Stunden einlaufen muss, bis wieder ein stabiler und niedriger Grundstrom erreicht ist. Dies ist sehr zeitaufwendig und mit der Messung einer großen Probenanzahl kaum vereinbar.

Bei der ESA-Zelle dagegen spielt das Problem der Passivierung aufgrund der großen Oberfläche der porösen Graphitelektroden praktisch keine Rolle. Erst bei 90%iger Beladung der Elektrodenoberfläche kommt es zu einem Empfindlichkeitsverlust [ESA, B]. Das bedeutet, dass mit der ESA-Zelle wesentlich mehr Proben unter den gleichen Bedin-

gungen vermessen werden können, bevor die Anlage ausgestellt und die Elektroden regeneriert werden müssen. Die HPLC-Bestimmungen mittels ELCD wurden daher im Folgenden nur noch unter Verwendung des ESA-Detektors durchgeführt.

Zur Kalibrierung wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 10 pg/10 µl bis 100 pg/10 µl vermessen. Die Arbeitsvorschriften sind im experimentellen Teil angegeben (7.2), die Messwerte unter Angabe statistischer Größen und des linearen Ausgleichs finden sich im Anhang (8.1.3). Die Kalibrierkurven sind in den Abb. 3.7a-d auf den folgenden Seiten dargestellt.

Die Methode eignet sich sehr gut zur Bestimmung der Estrogene bis in den unteren Pico-gramm-Bereich. Über das Signal-Rausch-Verhältnis ($S/N=10:1$) wurden für E1 und EE2 Bestimmungsgrenzen von 10 pg/10 µl, für E2 von 8 pg/10 µl und für E3 von 6 pg/10 µl ermittelt. Auffällig im Vergleich der Kalibrierungen ist die deutlich schlechtere Präzision der E3-Bestimmung (siehe Variationskoeffizienten V_k und Reststandardabweichungen s_y im Anhang 8.1.3)². Diese liegt wahrscheinlich im chromatographischen Verhalten des Estriols begründet, d.h. in seiner im Vergleich zu den anderen Estrogenen kurzen Retentionszeit an der RP18-Phase. (E3: 1,63 min; E2: 4,43 min; EE2: 5,28 min; E1: 5,85 min). Die Integration des Estriolpeaks ist durch die direkte Nachbarschaft zum Einspritzpeak stärker fehlerbehaftet als die der anderen Estrogene.

Nach HPLC/ELCD wurden Bestimmungsgrenzen ermittelt, die um den Faktor 50-100 niedriger als nach UV-Detektion, und damit in dem Konzentrationsbereich lagen, der für die spurenanalytische Bestimmung der Estrogene erforderlich ist. Bezüglich der Selektivität der Methode ist jedoch anzuführen, dass neben den Estrogenen wieder andere phenolische Verbindungen mit detektiert werden, was bei der Messung von Realproben zu Störungen durch Huminstoffe oder andere Phenole führen kann. Ein weiteres Problem ist die relativ schlechte Robustheit der elektrochemischen Detektion im Vergleich zur UV-Detektion, und die sich daraus ergebende schwierige Handhabung und Reproduzierbarkeit. Der Grund liegt in der leichten Störanfälligkeit der ELCD. Als Störfaktoren kommen hierbei vielfältigste Ursachen in Betracht, zu nennen sind z.B. Veränderungen der Elektrodenoberfläche durch Belegung mit Reaktionsprodukten oder Verunreinigungen der mobilen Phase mit elektrochemisch aktiven Verbindungen. Aber auch Druckschwankungen der Pumpe sowie Störungen durch äußere elektrische Felder haben einen großen Einfluss auf die Detektion.

² Die Variationskoeffizienten (V_k) wurden standardmäßig direkt aus den Flächenwerten bzw. -quotienten ermittelt.

Im Rahmen der Arbeit wurde die HPLC/ELCD zur Methodenentwicklung Probenvorbereitung – besonders für Messungen in niedrigen Konzentrationsbereichen – sowie für die Messung von Realproben eingesetzt.

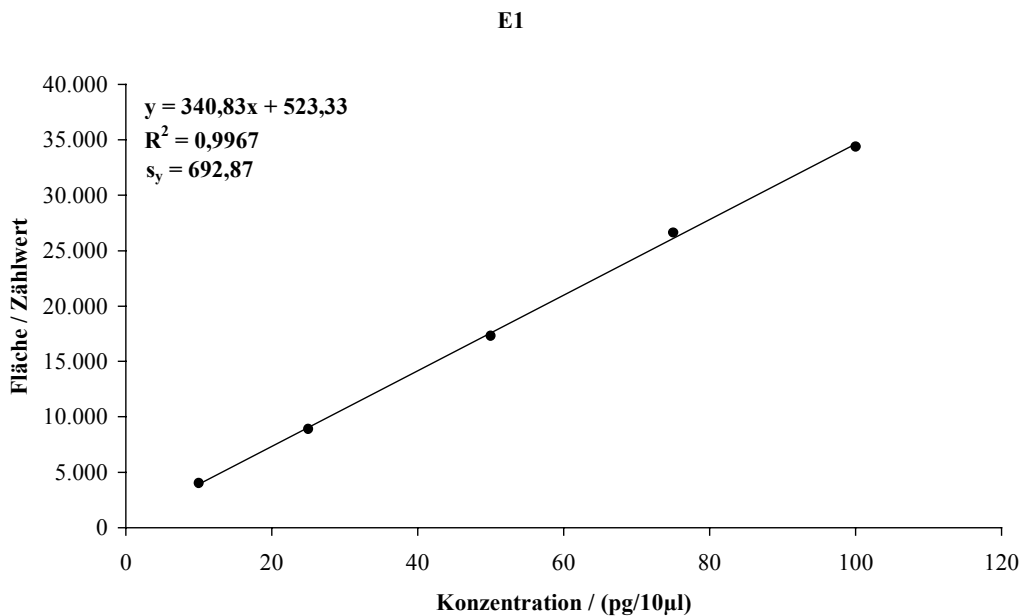


Abbildung 3.7a: Kalibrierkurve für **Estron**: 10-100 pg/10 µl

HPLC/ESA: Kanal 1: 250mV, Kanal 2: 450mV, manuelle Injektion von 10µl, Mittelwerte aus n=3
Angabe der Geradengleichung, des Bestimmtheitsmaßes R^2 und der Reststandardabweichung s_y

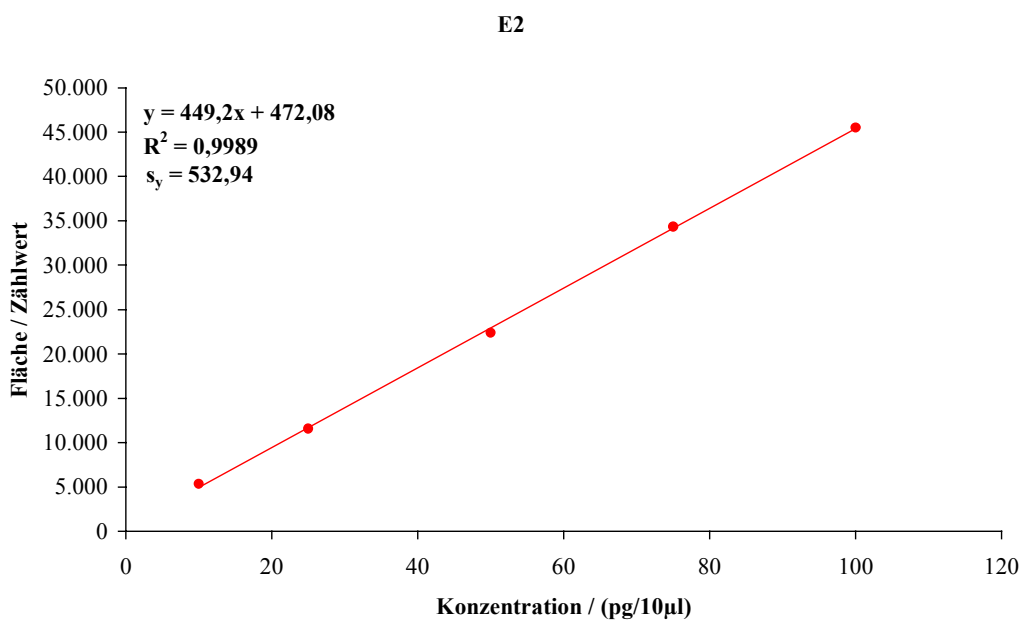


Abbildung 3.7b: Kalibrierkurve für **Estradiol**: 10-100 pg/10 µl

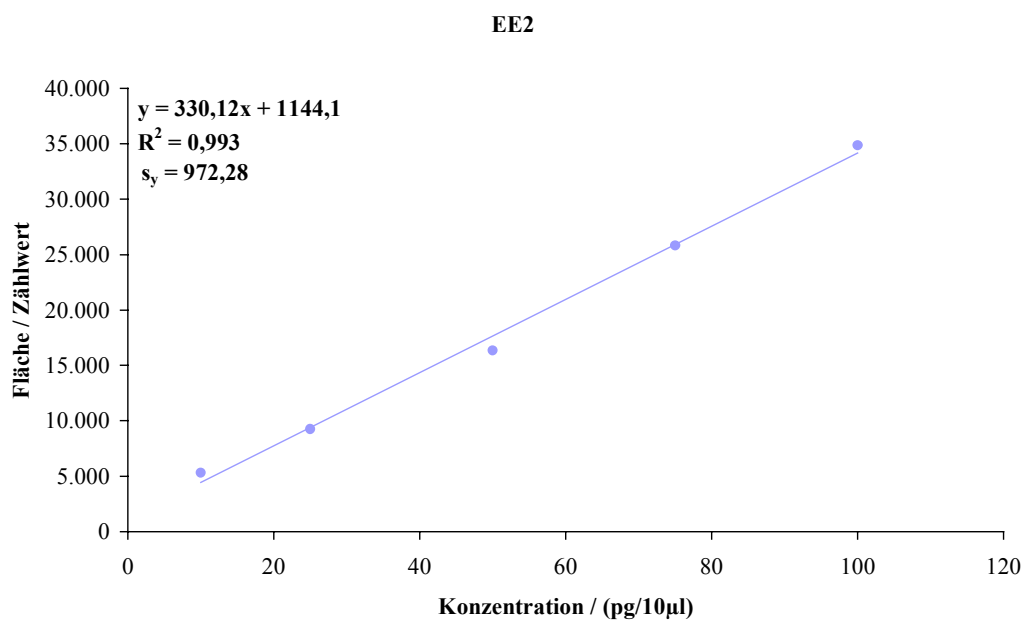


Abbildung 3.7c: Kalibrierkurve für **Ethinylestradiol**: 10-100 pg/10 µl

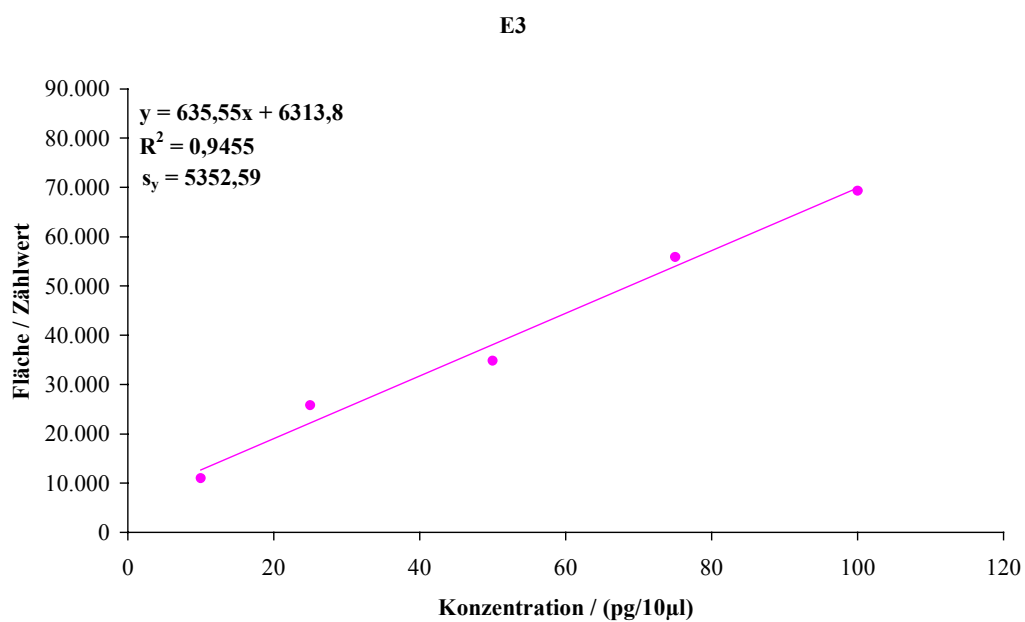


Abbildung 3.7d: Kalibrierkurve für **Estriol**: 10-100 pg/10 µl

3.3 GASCHROMATOGRAPHIE (GC)

Für die Estrogenanalytik sollte eine GC-Methode entwickelt werden, die sowohl für die Bestimmung der derivatisierten als auch der nicht derivatisierten Estrogene geeignet ist. Als Trennsäule kam eine unpolare Standardkapillarsäule des Phasentyps 5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan zum Einsatz. Nähere Angaben zu den Geräten und GC-Bedingungen sind dem experimentellen Teil (7.1.2.6) zu entnehmen.

In den Vor- und Optimierungsversuchen zur Entwicklung der GC- bzw. SPME-Methoden wurde fast ausschließlich mit Anlage C mit Flammenionisationsdetektor (FID) gearbeitet. Der FID zeichnet sich durch einen großen linearen Bereich aus und ist zur Detektion der meisten organischen Verbindungen geeignet. Ein wesentlicher Vorteil besteht auch in seiner recht einfachen Handhabung und Wartung.

Für die Messungen der Realproben, sowie für alle weiterführenden Optimierungsversuche wurde die massenspektrometrische Detektion eingesetzt. Die MS-Detektion zeichnet sich gegenüber der Flammenionisationsdetektion durch eine deutlich höhere Selektivität aus. Bei Messungen im Scan-Modus kann z.B. durch Vergleich mit Referenzspektren oder Referenzsubstanzen die Peakidentität und -reinheit ermittelt werden. Im SIM-Modus (selected ion monitoring) ist dies zwar nur noch eingeschränkt möglich, der Vorteil liegt hier aber in einer um den Faktor 10-100 verbesserten Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Mittels MS-Detektion werden in der Regel deutlich niedrigere Bestimmungsgrenzen als mittels Flammenionisationsdetektion erreicht. Für Messungen im Spurenbereich kam daher ausschließlich die MS zum Einsatz.

3.3.1 GC DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG

Obwohl die Estrogene aufgrund ihrer polaren funktionellen Gruppen keine idealen Analyte für eine gaschromatographische Analyse darstellen, sollte dennoch zunächst eine Bestimmung ohne Derivatisierung erprobt werden. Jeder Derivatisierungsschritt stellt schließlich einen zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt dar, der fehlerbehaftet ist und zu Verlusten an Probe führen kann.

Die folgenden Abbildungen zeigen Chromatogramme, die nach GC der Estrogene ohne Derivatisierung erhalten wurden. Hierzu wurden im oberen Chromatogramm (Abb. 3.8) Estron, Estradiol und Ethinylestradiol und im unteren nur Ethinylestradiol injiziert (Abb. 3.9).

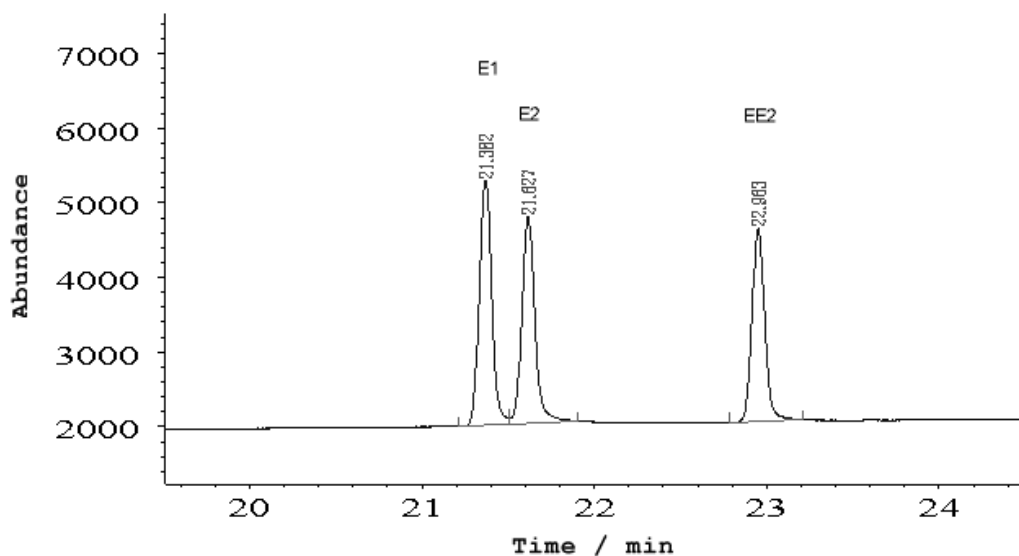


Abbildung 3.8: E1, E2 und EE2 jeweils 100 ng/μl, GC/FID

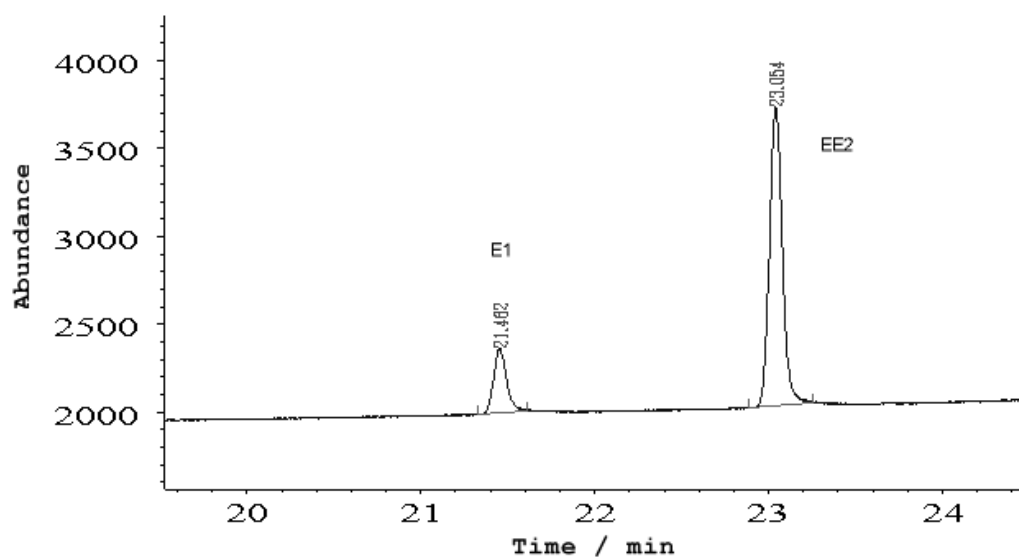


Abbildung 3.9: EE2, 100 ng/μl, GC/FID

Wie zum Teil auch aus den Chromatogrammen ersichtlich, traten bei der GC der Estrogene die folgenden Probleme auf:

- Estriol war ohne Derivatisierung praktisch nicht gaschromatographisch zu bestimmen, es erschien nur als kleiner Peak im Chromatogramm (ohne Abbildung).
- Ethinylestradiol war bei der gaschromatographischen Bestimmung nicht stabil, es zersetzte sich teilweise zu Estron (Abb. 3.9).

- Die Peaks der Estrogene wiesen ein Tailing auf, so dass Estron und Estradiol nicht vollständig basisliniengetrennt wurden (Abb. 3.8).

Die Beobachtungen können folgendermaßen erklärt werden:

⇒ Estriol mit seinen drei Hydroxygruppen ist die polarste und damit am wenigsten flüchtige der untersuchten Verbindungen. Im CRC Handbook of Chemistry and Physics ist E3 mit einem Schmelzpunkt von 288 °C angegeben und zusätzlich mit einem „d“ (für „decomposes“) gekennzeichnet. D.h.also, dass bei dieser Temperatur E3 bereits zersetzt wird [CRC, 1991]. Diese Zersetzung in Kombination mit dem hohen Schmelzpunkt ist wahrscheinlich der Grund für die schlechte GC-Gängigkeit des E3. Lösungen von Estron, Estradiol und Ethinylestradiol konnten im Gegensatz dazu auch ohne Derivatisierung direkt gaschromatographisch bestimmt werden. Abgesehen vom Ethinylestradiol wurden dabei reproduzierbare Peakflächen erhalten.

⇒ Problematisch bei der Bestimmung des Ethinylestradiols ist seine thermische Instabilität. Wahrscheinlich bereits während der Aufgabe im heißen Injektor kommt es zu einer teilweisen Abspaltung der Ethinylgruppe unter Bildung von Estron. Da Estron aber auch als Bestandteil der Umweltproben zu erwarten ist, würde diese Zersetzungsreaktion einen erhöhten Estrongehalt vortäuschen. Auf dieses Problem gibt es auch bereits Hinweise aus der Literatur [HOLTEY-WEBER, 1999A]. Durch Erniedrigung der Injektortemperatur wurde nun versucht, die Abspaltung der Ethinylgruppe zu verhindern. Die Chromatogramme zeigten jedoch, dass selbst bei einer Injektionstemperatur von 200 °C noch ein deutlicher Peak für Estron zu sehen war. Erst bei 150 °C wurde hauptsächlich EE2 erhalten. Da die Schmelzpunkte der Estrogene aber deutlich über 150 °C liegen (siehe 2.1.2), schien dieser Ansatz keine geeignete Methode darzustellen – Probenverluste und Probenverschleppungen wären unweigerlich die Folge.

Als Alternative bot sich noch der Einsatz eines Kaltaufgabesystems (KAS) an. Ein KAS ermöglicht es, den Verlauf der Injektortemperatur über ein Temperaturprogramm zu steuern. Man wählt für thermisch labile Verbindungen z.B. eine niedrigere Anfangstemperatur und steigerte diese dann durch Vorgabe einer bestimmten Heizrate kontinuierlich auf die gewünschte Endtemperatur. Nach erfolgter Injektion kann der Injektor dann noch für einige Minuten ausgeheizt werden, bevor die Temperatur für die nächste Messung wieder auf den Ausgangswert abgesenkt wird. Die eigenen Versuche zeigten jedoch, dass auch bei Verwendung eines solchen KAS die Bildung von Estron nicht vollständig verhindert werden konnte. Es wurde immer ein gewisser, allerdings nicht reproduzierbarer Anteil des Ethinylestradiols zersetzt.

Neben der Temperatur müssen also noch weitere Faktoren bei der Zersetzung des EE2 eine Rolle spielen. Dies könnte z.B. das Injektor- und Linerdesign, das Linervolumen oder die Aktivität des Liners sein. Diese Vermutungen wurden durch folgende Beobachtungen gestützt:

Bei direkter Injektion der Probenlösung war das Ausmaß der Zersetzung stets größer als nach Aufgabe mittels SPME (siehe 3.6.3). Dies kann eventuell dadurch erklärt werden, dass bei direkter Injektion durch das schlagartige Verdampfen des Lösemittels die Analytkonzentration im Liner sehr hoch ist, und die Analyte dadurch in direkten Kontakt mit der Lineroberfläche gelangen. Bei der SPME dagegen werden die Analyte langsamer aus der Faser freigesetzt und mit dem Trägergasstrom kontinuierlich auf die Säule überführt, so dass hier eine Zersetzung durch Kontakt mit der Lineroberfläche unwahrscheinlicher ist.

Der Vergleich direkt eingespritzter Proben an KAS und Hot-Split/Splitless-Injektor unter Verwendung jeweils neuer, deaktivierter Liner zeigte, dass die Form und Größe des Liners wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Zersetzung spielt. Im KAS, wo Liner mit recht kleinen Innendurchmessern und Einbuchtungen der Innenseite verwendet werden, war das Ausmaß der Zersetzung stets größer als im Hot-Split/Splitless-Injektor, wo größervolumige, gerade Liner zum Einsatz kommen.

Schließlich zeigten wiederum die SPME-Untersuchungen, dass auch kleine Gummistückchen, die aus dem Septum beim Einstechen der SPME-Faser ausgestanzt wurden und in den Liner fielen, die Zersetzung des EE2 förderten (siehe 3.6.3).

⇒ Das bei der GC der Estrogene beobachtete Tailing, und die sich daraus ergebende schlechtere Auflösung und schlechtere Bestimmungsgrenze, wird wahrscheinlich durch Adsorptionseffekte an aktiven Oberflächen im Liner oder freien OH-Gruppen in der Trennsäule verursacht.

Da das Problem der Zersetzung des Ethinylestradiols ohne Derivatisierung nicht behoben werden konnte und Estriol underivatisiert praktisch nicht GC-gängig war, wurden die folgenden quantitativen Bestimmungen nur mit Estron und Estradiol durchgeführt.

3.3.2 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG

Für Estron und Estradiol wurden Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich von 10-50 ng/1 µl aufgenommen. Die Proben wurden parallel durch GC/FID und GC/MS vermessen. Zur Korrektur des Dosierfehlers wurde Estradiol-17-acetat (E2-17ac) als interner Standard (IS) den Kalibrierlösungen zugesetzt. Die Verwendung eines deuterierten Standards, wie z.B. Estradiol- d_2 , war aufgrund der parallelen Nutzung von MS- und Flammenionisationsdetektion nicht möglich. Jede Konzentration wurde dreimal injiziert. Die Geräteparameter (7.1.2.6) und Arbeitsvorschriften zur Herstellung der Kalibrierlösungen (7.2) sind im experimentellen Teil angegeben, die Messwerte finden sich im Anhang (8.1.4). Für die MS-Detektion im SIM-Modus wurden pro Substanz jeweils zwei charakteristische Ionen vermessen, wobei eine Ionenspur zur quantitativen Bestimmung herangezogen wurde („Quantifier“) und die zweite der Absicherung der Identität diente („Qualifier“). Die Massenspektren der Estrogene sind im Anhang angegeben (8.2.1). Die folgenden Abbildungen zeigen die erhaltenen Kalibrierkurven nach FID- (Abb. 3.10a und b) und MS-Detektion (Abb. 3.11a und b).

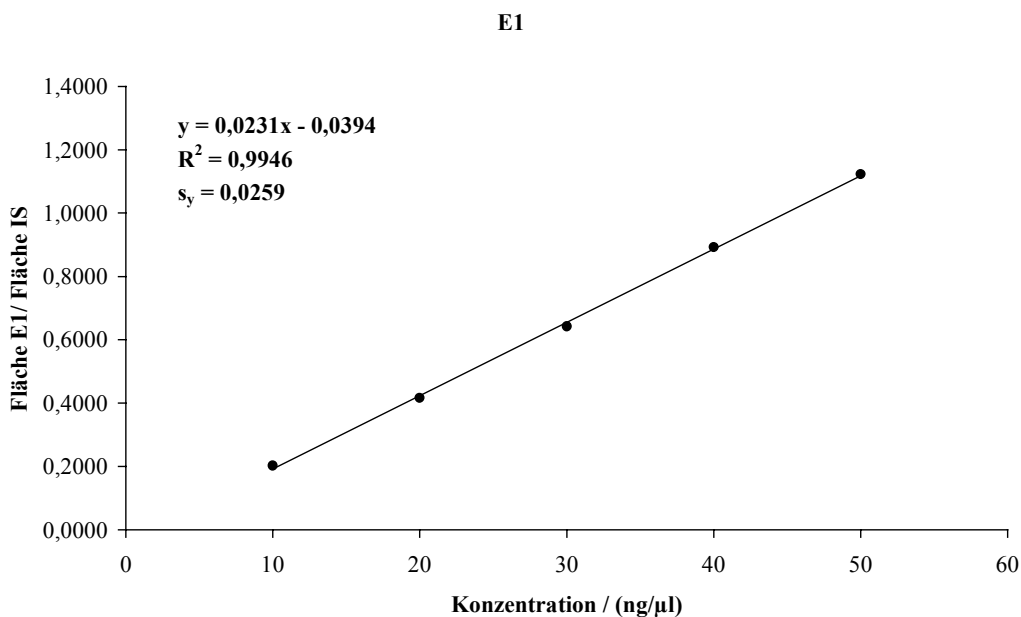


Abbildung 3.10a: Kalibrierkurve für **Estron**: 10-50 ng/µl, (E2-17ac: 50 ng/µl), **GC/FID** manuelle Injektion von 1µl, Mittelwerte aus n=3; Angabe der Geradengleichung, des Bestimmtheitsmaßes R^2 und der Reststandardabweichung s_y

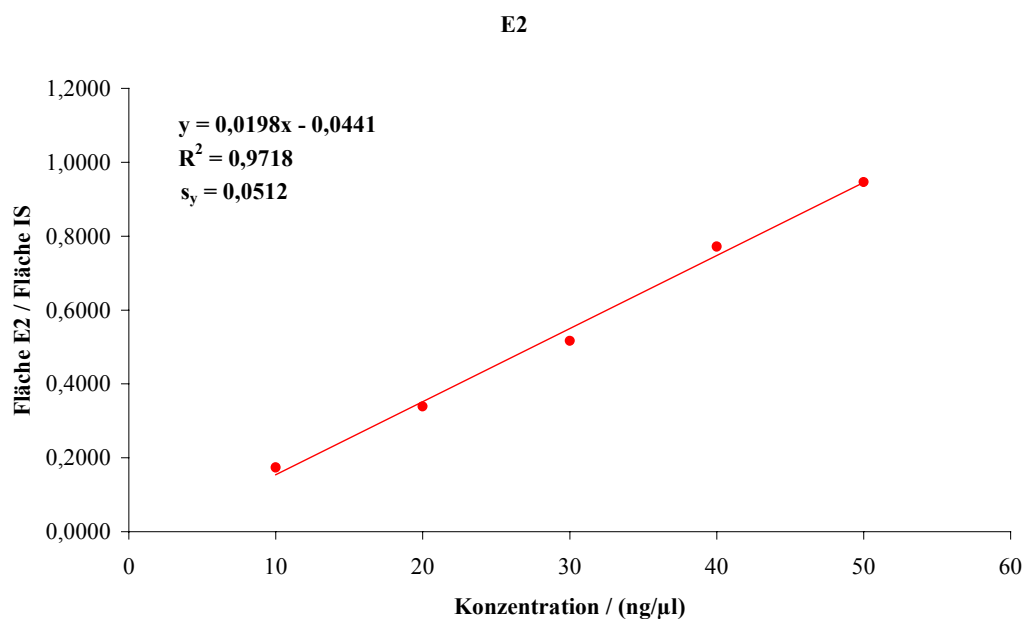


Abbildung 3.10b: Kalibrierkurve für **Estradiol**: 10-50 ng/μl, (E2-17-ac: 50 ng/μl),
GC/FID

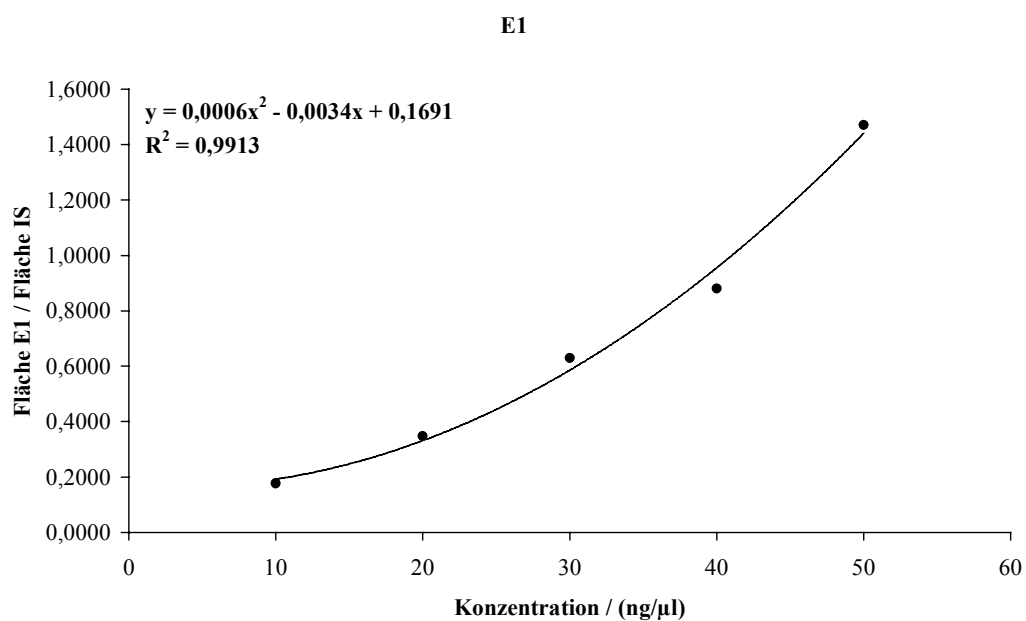


Abbildung 3.11a: Kalibrierkurve für **Estron**: 10-50 ng/μl, (E2-17-ac: 50 ng/μl),
GC/MS

manuelle Injektion von 1 μl, Mittelwerte aus n=3; Angabe der quadratischen Funktion und des Bestimmtheitsmaßes R^2

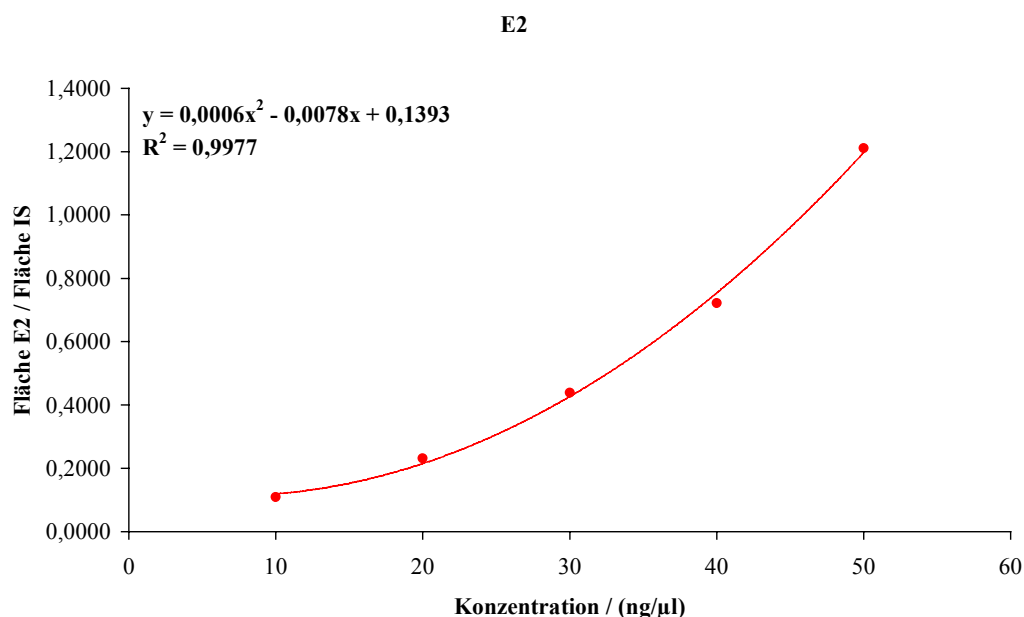


Abbildung 3.11b: Kalibrierkurve für **Estradiol**: 10-50 ng/μl, (E2-17-ac: 50 ng/μl), GC/MS

Die Messwerte nach GC/FID weisen einen linearen Zusammenhang über den vermessenen Konzentrationsbereich auf, die GC/MS-Messungen sind dagegen besser durch eine quadratische Regression zu beschreiben. Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte über das Signal-Rausch-Verhältnis. Für die Messung mittels GC/FID ergab dies für E1 und E2 eine BG (S/N=10:1) von 10 ng/μl und eine NG (S/N=3:1) von 3 ng/μl, für die MS-Bestimmung wurde eine BG von 20 ng/μl und eine NG von 5 ng/μl ermittelt.

Die Messungen zeigten, dass eine GC-Bestimmung von E1 und E2 prinzipiell ohne Derivatisierung möglich ist, wobei Messungen am GC/MS über eine quadratische Anpassung berechnet werden müssten. Durch entsprechende Optimierung der Analysenbedingungen könnte eventuell aber auch nach MS-Detektion eine lineare Kalibrierung durchführbar sein.

Für spurenanalytische Untersuchungen waren die erzielten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen jedoch zu hoch. Diese erfordern eine Quantifizierung von Konzentrationen bis zu 20 pg/μl, also nur ~1/1000 der hier erreichten Konzentration (siehe 2.4.2).

Die Methode kam im Folgenden in leicht abgewandelter Form für die SPME-Messungen der Estrogene zum Einsatz (siehe 3.6).

3.3.3 DERIVATISIERUNG DER ESTROGENE

Da die Estrogene, wie die vorhergehenden Ausführungen gezeigt haben, keine idealen Analyte für eine gaschromatographische Bestimmung sind, sollte nun eine Derivatisierung erprobt werden. Die Derivatisierung sollte die Chromatographie aller vier Estrogene ermöglichen und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode senken. Damit die Fehler und Ungenauigkeiten durch den zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt möglichst gering gehalten werden können, sollte die Derivatisierung die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Die Umsetzung sollte ein stöchiometrisch definiertes Derivat liefern und im Idealfall quantitativ verlaufen.
- Die Derivatisierung sollte reproduzierbar erfolgen.
- Die Umsetzung sollte möglichst schnell erfolgen, so dass die GC-Bestimmung direkt im Anschluss an die Derivatisierung erfolgen kann. Die Derivate sollten ausreichend stabil sein, um Messungen auch am folgenden Tag ohne Intensitätsverlust wiederholen zu können.
- Alle funktionellen Gruppen sollten mit einem Reagenz oder einer Reagenzmischung umgesetzt werden können.
- Auf die Entfernung von überschüssigem Reagenz sollte wenn möglich verzichtet werden, da dies zu Probenverlusten führen kann.
- Die entwickelte Methode sollte in ähnlicher Art und Weise auf die SPME-Analytik der Estrogene übertragbar sein.

3.3.3.1 Auswahl der Derivatisierungsmethode

Anhand der Forderungen wurden die in Frage kommenden Derivatisierungsreaktionen auf ihre Eignung zur Umsetzung der Estrogene geprüft.

Acylierung:

Zur Acylierung werden üblicherweise Säurehalogenide und -anhydride eingesetzt. Als Nebenprodukte der Umsetzung entstehen Säuren, die vor der GC-Bestimmung aus der Probe entfernt oder durch Verwendung basischer Lösemittel abgefangen werden müssen. Neuere und mildere Acylierungsreagenzien sind die Bisacylamide (MBTFA und MBHFBA). Die Umsetzung mit diesen erfolgt unter neutralen Bedingungen und die als Nebenprodukte entstehenden Acylamide sind aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit leicht aus

der Probe zu entfernen. Acylierungsreagenzien werden meist als perfluorierte Derivate angeboten.

⇒ Die Acylierung wurde als Derivatisierungsmethode für die Estrogene nicht weiter in Erwägung gezogen, da überschüssiges Derivatisierungsreagenz zum Schutz der GC-Säule in einem zusätzlichen Schritt aus der Probe entfernt werden sollte. Aufgrund der hohen Reaktivität der Reagenzien schien auch die direkte Derivatisierung an einer SPME-Faser ohne Zerstörung der Faserbeschichtung nicht möglich.

Alkylierung:

Zur Alkylierung werden verschiedene Reagenzien, oftmals Methylierungsmittel, wie z.B. Diazomethan, N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal (DMF-DMA), Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) oder Trimethylaniliniumhydroxid (TMAH) eingesetzt.

Vorversuche mit DMF-DMA und TMAH führten zu keiner vollständigen Methylierung der Hydroxygruppen der Estrogene, was wahrscheinlich daran lag, dass sich die alkoholischen und phenolischen OH-Gruppen in ihrer Reaktivität unterscheiden.

⇒ Aufgrund der unvollständigen Umsetzung wurde die Alkylierung als Möglichkeit der Derivatisierung nicht weiter verfolgt.

Oximbildung:

Bei der Silylierung werden Verbindungen mit Ketogruppen oftmals zu instabilen Trimethylsilyl-Enolether-Derivaten umgesetzt, deren Bildung dann meist auch nicht vollständig erfolgt [KNAPP, 1979]. Um diese Reaktion zu verhindern, muss die Ketogruppe zunächst durch Oximbildung geschützt und erst im Anschluss eine Silylierung durchgeführt werden. Donike konnte allerdings zeigen, dass bei Einhaltung entsprechender Reaktionsbedingungen auch eine quantitative Umsetzung zu den Enolether-Derivaten möglich ist [DONIKE, 1980].

⇒ Es sollte versucht werden, die Ketogruppe des Estrons quantitativ in den Trimethylsilyl-Enolether zu überführen. Der zusätzliche Schritt der Oximbildung wäre damit nicht erforderlich.

Silylierung:

Die Silylierung als quasi universelle Methode der Derivatisierung sollte prinzipiell die Umsetzung sowohl der alkoholischen und phenolischen Hydroxygruppen als auch der Carbonylgruppe des Estrons ermöglichen. Als Reagenzien werden neben den klassischen Silylierungsmitteln wie Trimethylchlorsilan (TMCS) und Hexamethyldisilazan (HMDS)

heute oftmals N,O-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) eingesetzt. Diese weisen eine höhere Reaktivität als die erstgenannten auf und stören durch Bildung sehr flüchtiger Nebenprodukte die Chromatographie nicht. Als das reaktivste Derivatisierungsmittel für Hydroxygruppen gilt das N-Trimethylsilyl-imidazol (TMSIM), welches sogar mit sterisch gehinderten OH-Gruppen sehr leicht reagiert.

Bei einer Silylierungsreaktion muss beachtet werden, dass die gebildeten Trimethylsilyl-Derivate (TMS-Derivate) hydrolyseempfindlich sind, d.h. die Umsetzungen müssen auf jeden Fall unter Wasserausschluss erfolgen. Stabilere Derivate können durch die Einführung einer tert.-Butyldimethylsilylgruppe (TBDMS) erhalten werden. Von Vorteil für quantitative Bestimmungen ist bei den TBDMS-Derivaten die Bildung sehr intensiver $M^+ - 57$ -Fragmentationen in der MS, von Nachteil dagegen die Größe der TBDMS-Gruppe. Eine Derivatisierung sterisch gehinderter Hydroxygruppe ist daher praktisch nicht möglich [DONIKE, 1980]. Als Reagenz wird oftmals das N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid (MBDSTFA) verwendet.

⇒ In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass mittels Silylierung sehr gute Ergebnisse bei der Derivatisierung der Estrogene zu erzielen waren. In der Literatur wurden Silylierungsreaktionen auch bereits im Anschluss an SPME-Anreicherungen beschrieben [HELALEH, 2001], [OKEYO, 1997].

Da die Silylierung sowohl für die direkte Umsetzung der Estrogene als auch in Kombination mit der SPME einsetzbar schien, wurde sie im Rahmen der Arbeit als Derivatisierungstechnik für alle GC-Bestimmungen ausgewählt.

3.3.3.2 Ermittlung geeigneter Silylierungsbedingungen für die Estrogene

Die Reaktion des Derivatisierungsreagenzes mit dem Analyten sollte im Idealfall quantitativ ablaufen. Dies gewährleistet eine maximale Ausbeute an Derivat und damit eine möglichst niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Für die Praxis von besonderer Bedeutung ist eine reproduzierbare Umsetzung, da die Reaktionen meist eben nicht zu 100% vollständig ablaufen.

Wie nun die Umsetzung eines Analyten mit dem Derivatisierungsreagenz erfolgt, hängt von folgenden Faktoren ab:

- Struktur des Analyten (z.B. Art der funktionellen Gruppen, räumliche Struktur des Moleküls)
- Art und Konzentration des Derivatisierungsreagenzes

- Reaktionsbedingungen (z.B. Temperatur, Reaktionszeit, Lösemittelzusatz, Katalysatorzusatz)

Das Ziel war es, ein geeignetes Derivatisierungsreagenz und geeignete Reaktionsbedingungen für die Silylierung der Estrogene zu finden. Die Untersuchungen wurden mit dem von Donike eingeführten N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) begonnen [DONIKE, 1969]. MSTFA ist ein universell einsetzbares, reaktives Silylierungsmittel, das ohne Katalysatorzusatz mit vielen Verbindungen innerhalb kurzer Zeit reagiert. Die entstehenden Nebenprodukte sind leicht flüchtig und überschüssiges Reagenz stört die Chromatographie nicht, so dass vor der GC keine Abtrennung erfolgen muss. Die Messungen wurden am GC/MS im Scan-Modus durchgeführt. Die Geräte- und Messbedingungen (7.1.2.6) sind ebenso wie die eingesetzten Derivatisierungsreagenzien (7.1.1) dem experimentellen Teil zu entnehmen. Für die Estrogene wurden jeweils getrennte Derivatisierungsansätze entsprechend der Arbeitsanweisung in 7.2 hergestellt. Estradiol- d_2 (d_2 -E2) wurde den Lösungen als interner Standard zugesetzt.

Die ersten Messungen zeigten, dass E1, E2 und E3 bereits nach 30-minütiger Reaktionszeit bei 80 °C zu ihren Trimethylsilylderivaten (E1-TMS, E2-TMS(2) und E3-TMS(3)) umgesetzt wurden. Die Reaktion des EE2 hingegen lieferte hingegen auch nach 60 min noch kein einheitliches Derivat. Im Totalionenstromchromatogramm (TIC) fanden sich stattdessen zwei Peaks (Abb. 3.12). Der eine Peak entsprach dem erwarteten EE2-TMS(2), der zweite stellte sich als E1-TMS heraus. Das beobachtete Estronderivat ist auch hier wieder ein Folgeprodukt der Abspaltung der Ethinylgruppe (siehe auch 3.3.1), da die OH-Gruppe in 17-Position des EE2 aufgrund der sterischen Hinderung durch die Ethinylgruppe nur langsam silyliert wird.

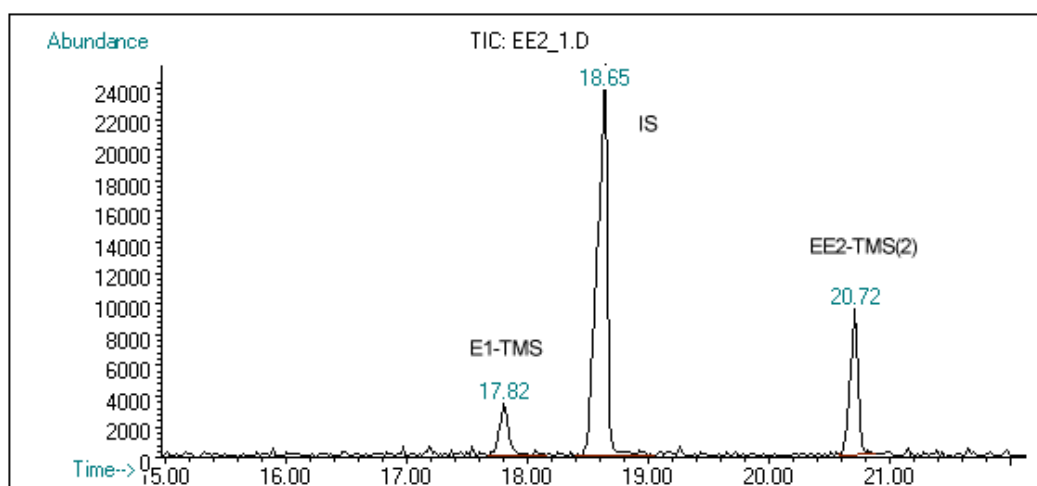


Abbildung 3.12: TIC von EE2 und d_2 -E2 (IS) nach Derivatisierung mit MSTFA, 80 °C, 60 min

Durch Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute an EE2-TMS(2) erhöht werden. Betrachtet man aber das Verhalten von Estron bei längerer Derivatisierungszeit, so zeigte nun auch dieses einen zweiten Peak im Chromatogramm (Abb. 3.13a). Nach Auswertung des zugehörigen Massenspektrums (Abb. 3.13b) konnte der Peak als zweifach silyliertes Estron (E1-TMS(2)) identifiziert werden. Neben der Silylierung der Hydroxygruppe kam es zur angesprochenen TMS-Enoletherbildung an der Ketogruppe ein.

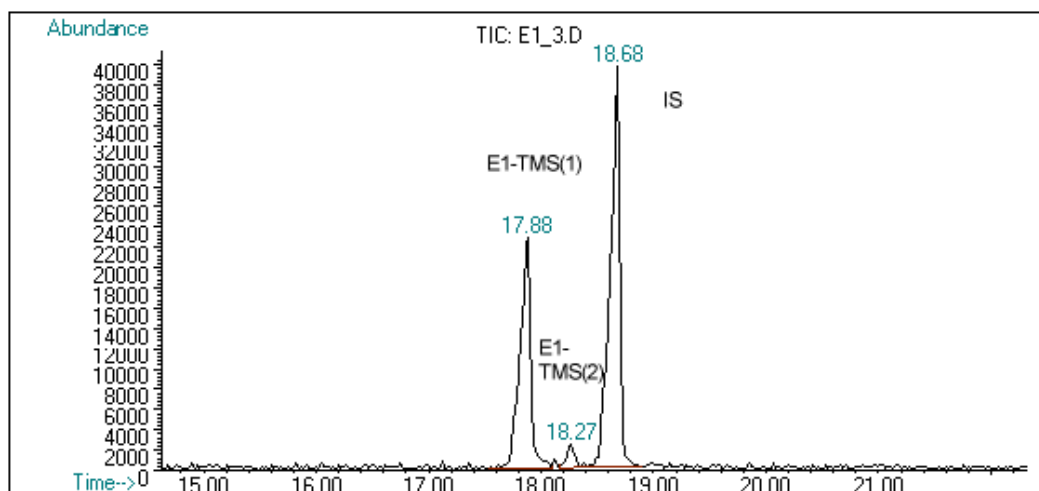


Abbildung 3.13a: TIC von E1 und d_2 -E2 (IS) nach Derivatisierung mit MSTFA, 80 °C, 2 h

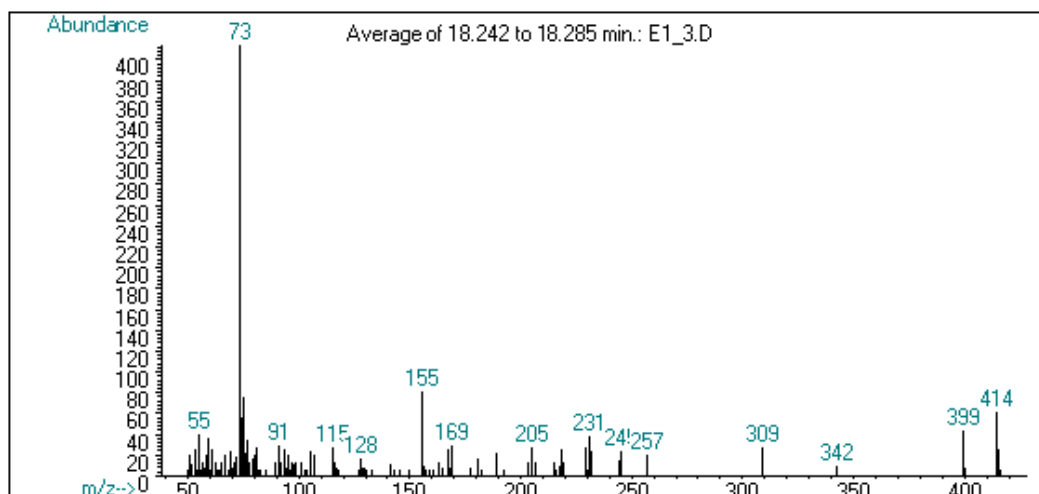


Abbildung 3.13b: Massenspektrum des Peaks E1-TMS(2) aus Abb. 3.13a

Um die Umsetzung auf die Seite des Enolether-Derivates zu verschieben, wurde die Reaktionszeit nochmals verlängert, was jedoch keinen Erfolg zeigte. Eine Erhöhung der Derivatisierungstemperatur schien auch nicht sinnvoll, da diese mit 80 °C bereits recht hoch gewählt war. Außerdem musste aufgrund der verwendeten Schraubdeckelials bei höhe-

ren Temperaturen mit Verlusten an Derivatisierungsmittel und damit mit einer Konzentrationsänderung der Probe gerechnet werden.

Auch nach Umsetzung von Estron bei Raumtemperatur (RT) für 24 h wurde ein zweiter Peak für E1-TMS(2) erhalten.

Die Untersuchungen zeigten, dass MSTFA (zumindest ohne Zusatz weiterer Derivatisierungsmittel) kein geeignetes Reagenz für die Derivatisierung der untersuchten Estrogene darstellt. Um die Silylierung analytisch nutzen zu können, sollte vielmehr ein Reagenz gefunden werden, dass sowohl Ethinylestradiol als auch Estron unter den gleichen Reaktionsbedingungen zu einheitlichen Produkten umzusetzen vermag.

Folgende Silylierungsreagenzien wurden daher neben MSTFA getestet:

TMSIM	N-Trimethylsilyl-imidazol
TMSI	Trimethyliodsilan
Sylon BTZ	(BSA/TMCS/TMSIM) N,O-bis(Trimethylsilyl)acetamid/ (3:2:3) Trimethylchlorsilan/ N-Trimethylsilyl-imidazol

In Vorversuchen erwies sich der Zusatz dieser Reagenzien als Katalysatoren zu MSTFA als sehr vielversprechend. Vergleichende Messungen wurden daraufhin mit entsprechenden Reagenzgemischen durchgeführt:

- A) MSTFA mit 0,1% TMSIM
- B) MSTFA mit 5% TMSIM
- C) MSTFA mit 5% Sylon BTZ
- D) Sylon BTZ
- E) MSTFA:DTE (Dithioerythrit):TMSI (1000:2:4)

Die Beurteilung der Derivatisierung erfolgte anhand der Totalionenstromchromatogramme. Als „quantitativ“ oder „vollständig“ wurde eine Umsetzung verstanden, die neben dem Hauptderivat keine zusätzlichen Peaks im Chromatogramm erkennen ließ und bei der sich das Peakflächenverhältnis zwischen Derivat und internem Standard auch bei Verlängerung der Reaktionszeit nicht mehr änderte. Diese Art der Auswertung stellt eine vereinfachte Methode dar, die gewählt wurde, da die derivatisierten Verbindungen als Vergleichsstandards nicht erhältlich bzw. nicht ausreichend stabil waren. Als interner Standard wurde Estradiol- d_2 ausgewählt. d_2 -E2 wurde auch in allen folgenden GC/MS-

Messungen als interner Standard oder als Surrogat-Standard eingesetzt. Für die Derivatisierungsuntersuchungen hätte besser ein interner Standard verwendet werden sollen, der selbst nicht derivatisiert wird, sich aber chromatographisch trotzdem wie die zu untersuchende Analyte verhält. Eine Substanz, die diese Forderungen erfüllte, stand allerdings nicht zur Verfügung. Der Fehler durch die Verwendung von d_2 -E2 schien jedoch vernachlässigbar zu sein, da d_2 -E2 ebenso wie E2 bereits nach 30 min praktisch vollständig zum d_2 -E2-TMS(2) umgesetzt wurde.

A) MSTFA mit 0,1% TMSIM

N-Trimethylsilyl-imidazol (TMSIM) gilt als das reaktivste Silylierungsmittel zur Umsetzung von Hydroxygruppen, selbst wenn diese sterisch gehindert sind. Es sollte daher versucht werden, durch Zusatz dieses Reagenzes zu MSTFA die Umsetzung von Ethinylestradiol in die Richtung des zweifach silylierten Derivates zu lenken.

Die ersten Messungen zeigten allerdings bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 80 °C einen zweiten Peak im Chromatogramm. Neben EE2-TMS(2) war eine zweite Verbindung der Masse 512 entstanden (siehe Abb. 3.14a und b).

Aufgrund einer Massendifferenz von 72 zum zweifach silylierten EE2 und der längeren Retentionszeit des zweiten Peaks musste angenommen werden, dass es sich um die dreifach silylierte Verbindung handelte, d.h. es musste zusätzlich eine Derivatisierung der Ethinylgruppe erfolgt sein. Diese Reaktion war zunächst nicht zu erwarten gewesen, da der pK_s -Wert der Ethinylgruppe ähnlich dem Acetylen im Bereich von 25 liegt [ROTH, 1990]. Die Ethinylgruppe stellt somit nur eine sehr schwache Säure dar, die allerdings mit bestimmten Metallionen, wie z.B. Ag^+ , Cu^+ und Hg^{2+} , unter Bildung von Acetylidreagenzien reagieren kann [ROTH, 1990], [MÜLLER, 1961]. Dieses Reaktionsprinzip wird auch bei der Bestimmung des Ethinylestradiols im Arzneibuch [Ph. Eur., 1997], sowie bei seiner voltammetrischen Bestimmung genutzt (siehe auch 2.4.1.2). Es wurde daher angenommen, dass auch hier eine solche Acetylidbildung durch Reaktion mit Schwermetallionen, die wahrscheinlich als Verunreinigung im Derivatisierungsreagenz enthalten waren, erfolgte. Das gebildete Acetylid reagiert dann in einem zweiten Reaktionsschritt als Lewis-Base mit dem Silylierungsreagenz.

Durch Verlängerung der Reaktionszeit wurde versucht, die Umsetzung auf die Seite des EE2-TMS(3) zu verschieben, was jedoch nicht gelang.

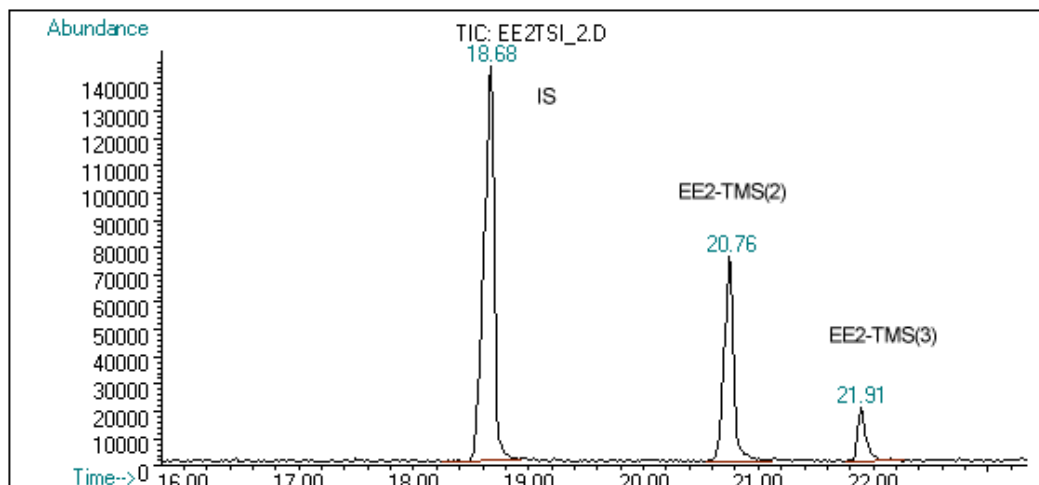


Abbildung 3.14a: TIC von EE2 und d_2 -E2 nach Derivatisierung mit MSTFA (0,1% TMSIM), 80 °C, 30 min

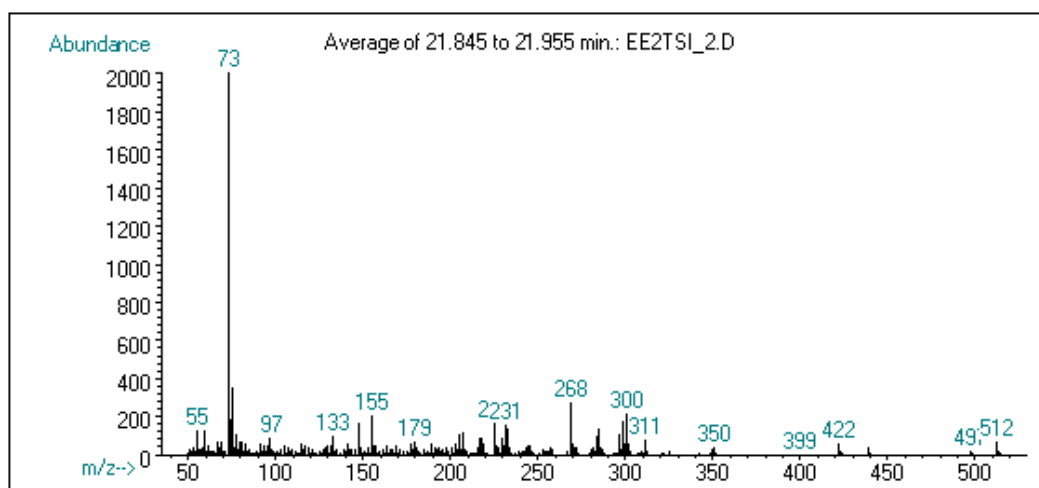


Abbildung 3.14b: Massenspektrum des Peaks EE2-TMS(3) aus Abb. 3.14a

Die Derivatisierung von E1 lieferte unter den gleichen Reaktionsbedingungen wieder zwei Peaks für E1-TMS und E1-TMS(2).

Nach 24 h bei Raumtemperatur ergab weder die Umsetzung des E1 noch die des EE2 ein einheitliches Reaktionsprodukt.

B) MSTFA mit 5% TMSIM

Eine Erhöhung des TMSIM-Anteils auf 5% sollte die Reaktion auf die Seite der persilylierten Derivate verschieben, brachte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Es wurden auch hier wieder mehrere Derivate erhalten.

Daraufhin wurde eine Derivatisierung mit reinem TMSIM versucht. Die erhaltenen Peaks waren aber von geringer Intensität und z.T. nicht als die silylierten Estrogenderivate zu identifizieren. Wahrscheinlich wäre der Zusatz eines indifferenten Lösemittels erforderlich gewesen (siehe auch Punkt D).

C) MSTFA mit 5% Sylon BTZ (BSA:TMCS:TMSIM / 3:2:3)

Durch den Zusatz von Sylon BTZ waren in der Reagenzmischung neben TMSIM noch BSA und TMCS enthalten. BSA stellt wie MSTFA ein universell einsetzbares Silylierungsmittel dar, und TMCS ist ein oft für Silylierungsreaktionen verwendeter Katalysator. Die Messungen ergaben, dass MSTFA mit einem 5%igem Sylon BTZ-Anteil ein sehr reaktives Reagenz ist, welches mit E1, E2 und E3 bereits bei Raumtemperatur nach 30 min vollständig reagierte. Unter diesen Bedingungen war die Bildung von E1-TMS(2), also die Silylierung der Ketogruppe, praktisch zu vernachlässigen. Sie trat aber bei längerer Reaktionszeit bzw. höheren Temperaturen wieder auf. Problematisch war erneut die Derivatisierung des EE2. Bereits nach 30 min bei Raumtemperatur entstand neben dem erwünschten EE2-TMS(2) wieder EE2-TMS(3). Durch Temperaturerhöhung änderte sich das Verhältnis der beiden Peaks zueinander kaum, d.h. auch hier war im Rahmen der gewählten Bedingungen die Umsetzung nicht in Richtung eines einheitlichen Derivates zu lenken.

Ein ähnliches Derivatisierungsreagenz (MSTFA mit 3,3% Sylon BTZ und 2% Pyridin) wurde auch in einer Veröffentlichung von Holtey-Weber zu Möglichkeiten der Online-Silylierung endokrin wirksamer Substanzen vorgestellt [HOLTEY-WEBER, 1999B]. Das Auftreten von E1-TMS(2) und EE2-TMS(3) beschreibt Holtey-Weber jedoch nicht. Er optimierte die Reagenzzusammensetzung allerdings auch speziell für die Derivatisierung von EE2 und beurteilte das Ergebnis am Verschwinden des E1-TMS-Peaks. Es könnte daher möglich sein, dass die Entstehung anderer Peaks so nicht bemerkt wurde.

D) Sylon BTZ (BSA:TMCS:TMSIM / 3:2:3)

Sylon BTZ wird auch allein als sehr potentes Derivatisierungsmittel eingesetzt. Die Verwendung ohne Zusatz eines weiteren Lösemittels ergab jedoch sehr schlechte Peakformen. Die Derivate erschienen meist als Doppelpeaks im Chromatogramm. Außerdem fanden sich im Gegensatz zu den anderen getesteten Derivatisierungsreagenzien eine große Zahl zusätzlicher Peaks im Chromatogramm, bei denen es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen aus dem Reagenz selbst handelte.

Durch Verdünnen des Reaktionsansatzes mit Hexan direkt vor der Chromatographie

konnte die Peaksymmetrie verbessert werden. Es bestand jedoch auch hier das Problem, dass weder E1 noch EE2 zu einem einheitlichen Derivat umgesetzt werden konnten.

E) MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4)

Die gewünschte, stöchiometrisch zu einheitlichen Derivaten ablaufende Umsetzung der Estrogene gelang schließlich unter Verwendung einer Mischung aus MSTFA, Dithioerythrit (DTE) und Iodtrimethylsilan (TMSI). Dieses Reagenz wurde in Anlehnung an zwei Veröffentlichungen zur Hormonanalytik in der Umwelt getestet [SCHLETT, 1996], [KUCH, 2000].

Die Abbildungen zeigen das Ergebnis einer 30-minütigen Derivatisierung bei 80 °C. Sowohl E1 als auch EE2 wurden quantitativ in ihre zweifach silylierten Derivate überführt. Da für diese Messungen eine neue GC-Säule zum Einsatz kam, haben sich die Retentionszeiten der Substanzen etwas geändert. Zur Peakzuordnung sind noch einmal die Totalionenstromchromatogramme mit den zugehörigen Massenspektren der Peaks von E1-TMS(2) und E2-TMS(2) angegeben (Abb. 3.15a und b sowie 3.16a und b).

Der Erhalt einheitlicher Derivate nach Verwendung dieser speziellen Reagenzmischung aus MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) kann wie folgt erklärt werden. Das als Katalysator zugesetzte TMSI hat eine große Aktivität zur Enolisierung und Trimethylsilylierung der Ketogruppe, so dass die Ketogruppe des Estrons innerhalb kurzer Zeit vollständig silyliert wird [DONIKE, 1980]. E1 wird also quantitativ in das zweifach silylierte Derivat E1-TMS(2) überführt. DTE verhindert dagegen wahrscheinlich durch Komplexbildung von Schwermetallspuren die Acetylidbildung des Ethinylestradiols. EE2 wird daher nur zur zweifach silylierten Verbindung EE2-TMS(2) umgesetzt.

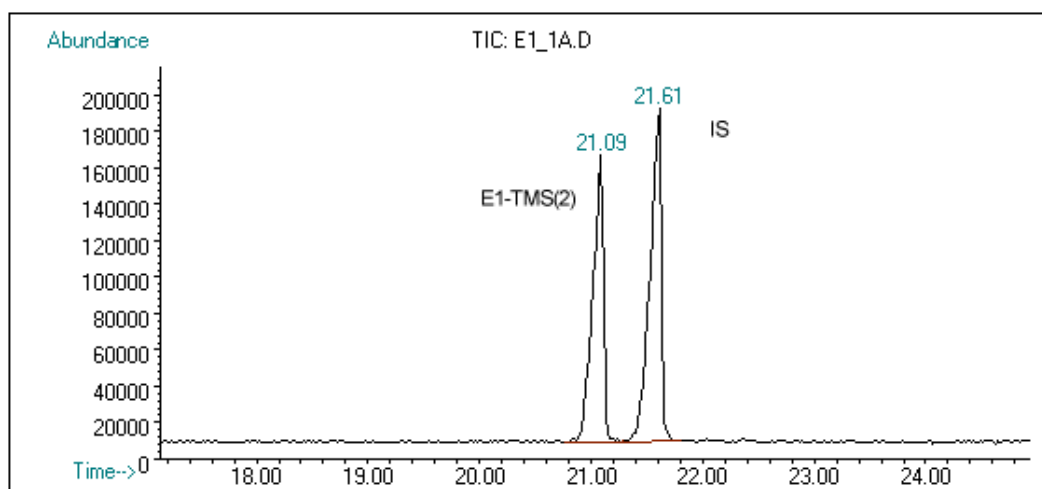


Abbildung 3.15a: TIC von E1 und d_2 -E2 nach Derivatisierung mit MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4), 80 °C, 30 min

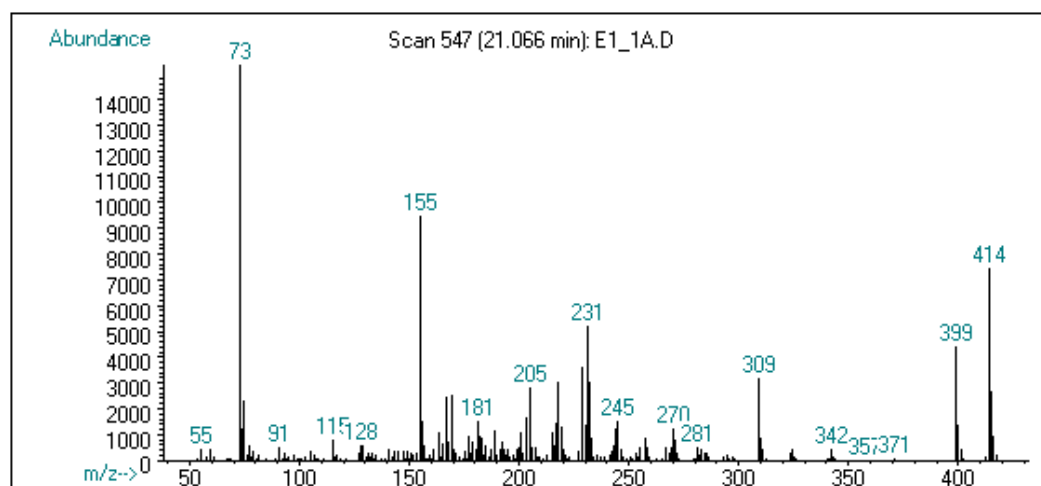


Abbildung 3.15b: Massenspektrum des Peaks E1-TMS(2) aus Abb. 3.15a

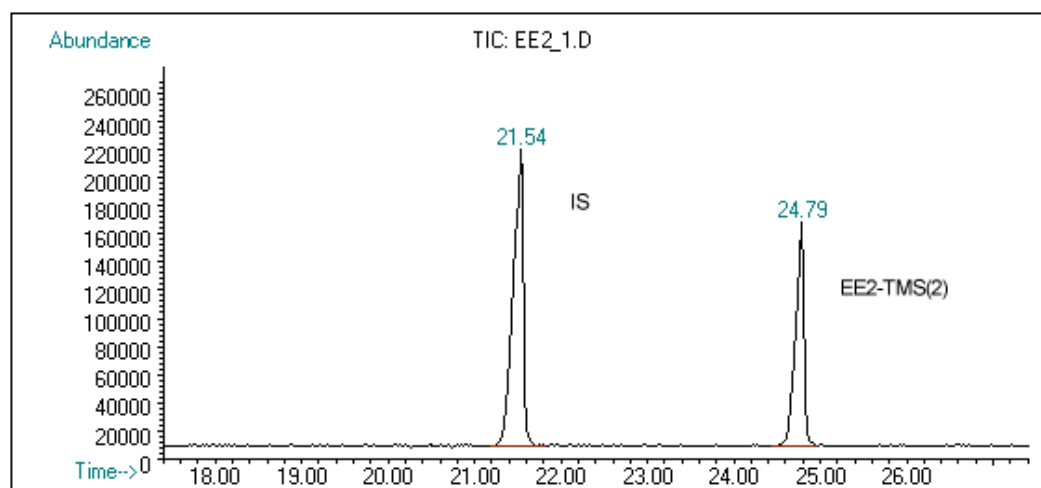


Abbildung 3.16a: TIC von EE2 und d_2 -E2

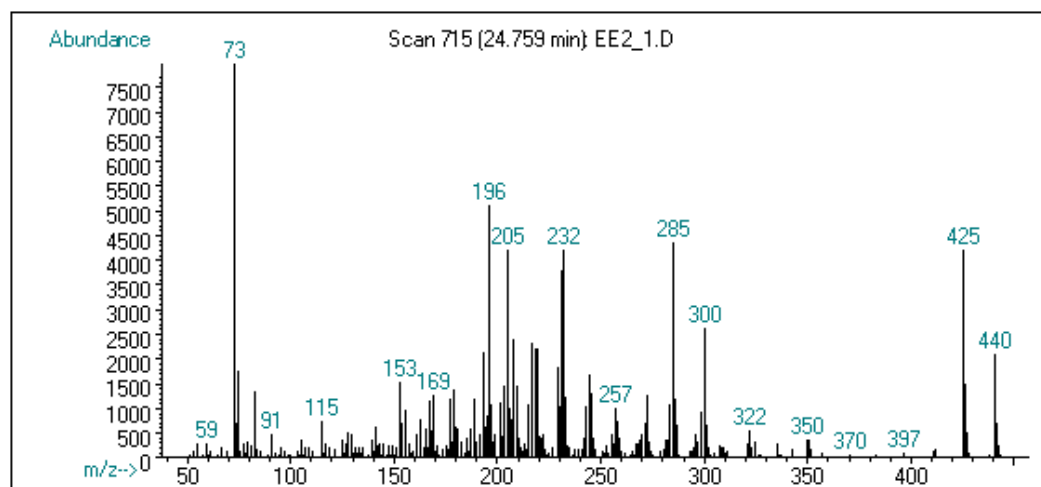


Abbildung 3.16b: Massenspektrum des Peaks EE2-TMS(2) aus Abb. 3.16a

Bei den Versuchen konnte allgemein beobachtet werden, dass die Reproduzierbarkeit der Messungen sehr stark von Alter und Zustand der Derivatisierungsmittel abhängt. MSTFA und TMSIM wurden z.B. in Bördelflaschen bezogen, die mit Gummisepten verschlossen waren. Das Durchstechen der Septen führt dazu, dass kleine Gummistückchen in das Reagenz fallen. Die Reaktivität eines so verunreinigten Reagenzes war wesentlich niedriger als die eines frisch geöffneten, so dass zur Herstellung der Derivatisierungsmittel stets neue Flaschen verwendet werden mussten.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde auch die Verwendung von MBDSTFA (N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid) zur Darstellung von tert.-Butyldimethylsilyl-Derivaten erprobt. Dieses erwies sich aber, wie bereits bei Donike beschrieben, als nicht geeignet zur Umsetzung von EE2 [DONIKE, 1980]. Aufgrund der sterischen Hinderung durch die 17 α -Ethinylgruppe war es nicht möglich die benachbarte OH-Gruppe zu silylieren.

3.3.4 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG

Unter Verwendung des Derivatisierungsreagenzes MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) wurde eine Kalibrierung der Estrogene ausgehend von Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 50-250 pg/ μ l durchgeführt. Als interner Standard wurde allen Proben Estradiol- d_2 in einer Konzentration von 400 pg/ μ l zugesetzt. Die Herstellung der Lösungen sowie die Derivatisierungsvorschrift sind den Arbeitsanweisungen im experimentellen Teil (7.2) zu entnehmen. Die Messungen wurden am GC/MS im SIM-Modus durchgeführt (7.1.2.6). Für jede Verbindung wurden zwei bzw. drei (EE2) charakteristische Ionen vermessen. Die Quantifizierung erfolgte jeweils über das Molekülion der derivatisierten Verbindung. Da im Spektrum von EE2-TMS(2) die Intensität des Molekülions relativ gering ist (siehe Massenspektren im Anhang 8.2), wurde zur quantitativen Bestimmung des Ethinylestradiols die Ionenspur m/z 425 integriert. 1 μ l der Probenlösung wurde manuell injiziert. Die Kalibrierung erfolgte als Doppelbestimmung.

Um möglichst niedrige Nachweisgrenzen mittels GC/MS zu erreichen, mussten zunächst die Geräteeinstellungen optimiert werden. Die wichtigsten Parameter waren:

- Tuning:
Als Variationsmöglichkeiten sind z.B. die Wahl der Tuning-Massen, das Intensitätsverhältnis der Massen, die Massenauflösung bzw. Massensignaltbreite zu nennen.

- Spannung am Elektronenvervielfacher (Multiplier):
Eine Erhöhung der Multiplier-Spannung kann die Messempfindlichkeit erhöhen. Ab einem gewissen Grad verschlechtert sich aber das Signal-Rausch-Verhältnis, so dass eine weitere Erhöhung dann nicht mehr sinnvoll ist.
 - Messzeit pro Ion:
Eine Verlängerung der Messzeit pro Ion erhöht ebenfalls die Empfindlichkeit der Messung. Eine deutliche Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze kann durch die SIM-Technik (selected ion monitoring) erzielt werden. Im SIM werden nur wenige, ausgewählte Ionen vermessen, so dass sich die Messzeit pro Ion entsprechend verlängert.
 - Ionisierungsenergie:
Bei der EI (Elektronenionisation) geht man standardmäßig von einer Ionisierungsenergie von 70 eV aus. Durch Erniedrigung der Ionisierungsenergie kann u.U. die Ausbeute an Molekülon erhöht werden.
- ⇒ Das Tuning erfolgte mit PFTBA ($m/z=69, 219$ und 502) zunächst unter Verwendung der automatischen Tuning-Programme der MS. Sehr gute Ergebnisse bezüglich Empfindlichkeit und Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit dem „EI sensitivity tuning“ (Eisens) erzielt. Das Eisens optimiert die Einstellungen der MS auf höchste Empfindlichkeit im Massenbereich von 50-500 amu unter besonderer Wichtung der höheren Massen. Die Peakweite wird beim Eisens größer als beim üblichen „Standard Autotune“ gesetzt, was eine weitere Erhöhung der Signalintensität bewirkt. Das Eisens ist besonders gut für Messungen einsetzbar, die eine hohe Empfindlichkeit und/oder niedrige Nachweisgrenze erfordern. Weniger geeignet ist es dagegen für Identitätsuntersuchungen anhand von Vergleichen mit Bibliotheksspektren, da sich die Massenverhältnisse von Tuning zu Tuning unterscheiden und nicht auf ein fixes Verhältnis zueinander eingestellt sind. Für die hier durchzuführenden spurenanalytischen Untersuchungen der Estrogene waren die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen das entscheidende Kriterium. Die automatische Durchführung des Tunings bot aufgrund der guten Reproduzierbarkeit außerdem einen entscheidenden Vorteil, so dass die MS im Folgenden standardmäßig mittels Eisens kalibriert wurde.
- ⇒ Um die Empfindlichkeit der Messungen weiter zu steigern, wurde die Multiplier-Spannung um 300 V über den ermittelten Tuningwert eingestellt. Eine größere Spannung schien nicht sinnvoll, da die Lebensdauer des Multipliers durch hohe Spannungen verkürzt wird.

- ⇒ Die Detektion erfolgte im SIM-Modus. Die Messzeit pro Ion betrug 100 ms.
- ⇒ Eine Reduktion der Ionisierungsenergie brachte keine Vorteile, so dass im Folgenden mit 70 eV gearbeitet wurde.

Die Graphiken 3.17a-d zeigen die Kalibrierkurven der Estrogene nach Silylierung. Die zugehörigen Messwerte unter Angabe des linearen Ausgleichs finden sich im Anhang (8.1.5).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode wurden über das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt:

	BG (S/N=10:1)	NG (S/N=3:1)
E1:	30 pg/μl	10 pg/μl
E2:	10 pg/μl	5 pg/μl
EE2:	50 pg/μl	20 pg/μl
E3:	30 pg/μl	10 pg/μl

Die Werte liegen in dem für die spurenanalytische Bestimmung der Estrogene erforderlichen Konzentrationsbereich (~20 pg/μl, siehe 2.4.2). Mit entsprechender Anreicherung sollten daher nach Derivatisierung und GC/MS Estrogen-Konzentrationen im unteren ppt-Bereich (ng/l) analysierbar sein.

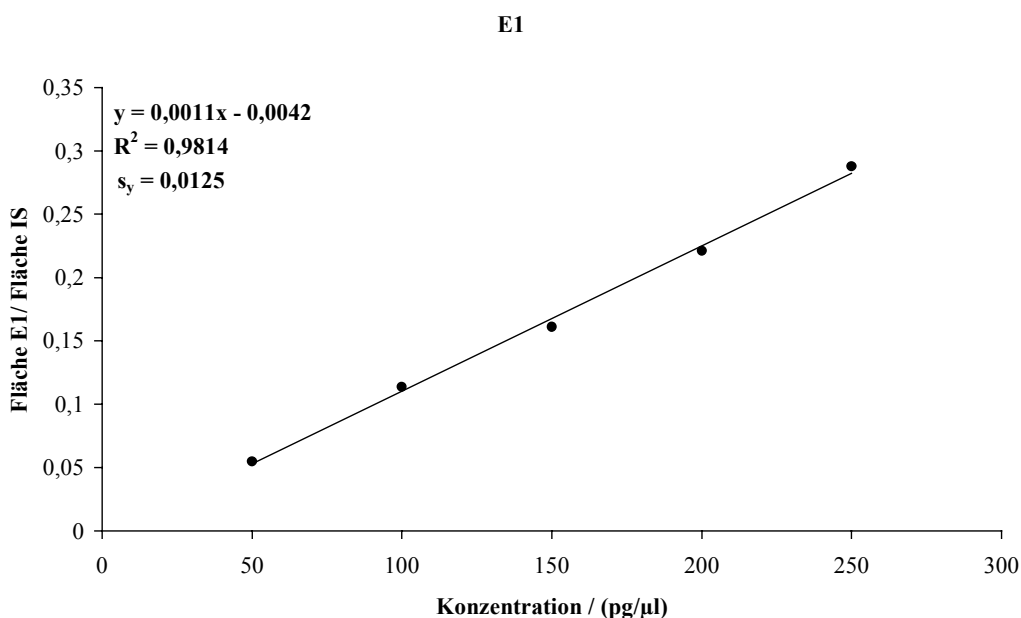


Abbildung 3.17a: Kalibriergerade für **Estron** als E1-TMS(2): 50-250 pg/μl, (Estradiol- d_2 : 400 pg/μl), GC/MS (SIM): Quotient aus 414,2/418,2
Mittelwerte aus n=2; Angabe der Geradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes (R^2)

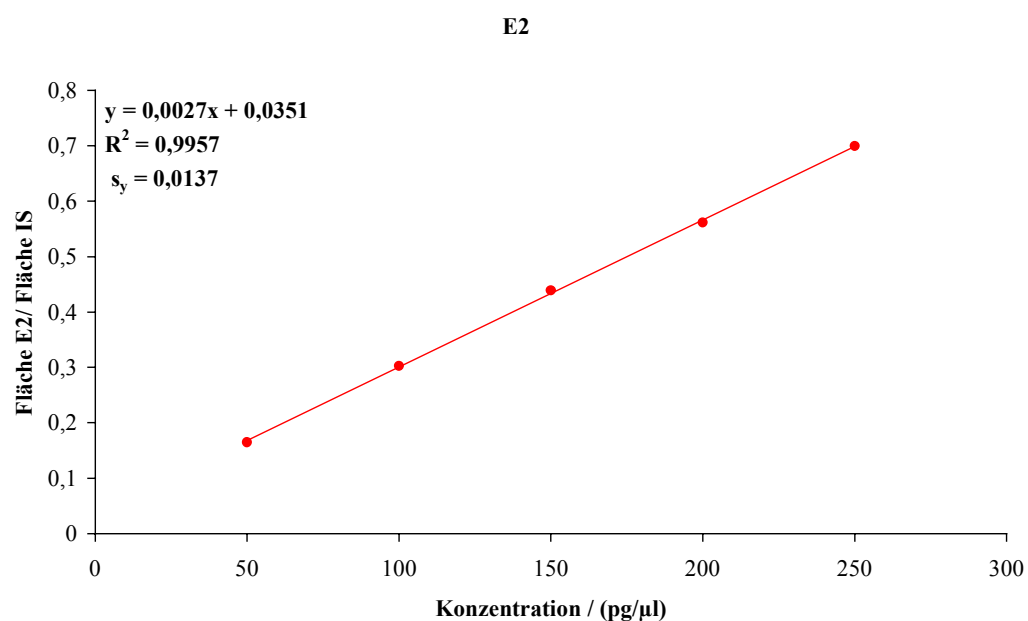


Abbildung 3.17b: Kalibriergerade für **Estradiol** als E2-TMS(2): 50-250 pg/μl, (Estradiol- d_2 : 400 pg/μl), GC/MS (SIM): Quotient aus 416,2/418,2

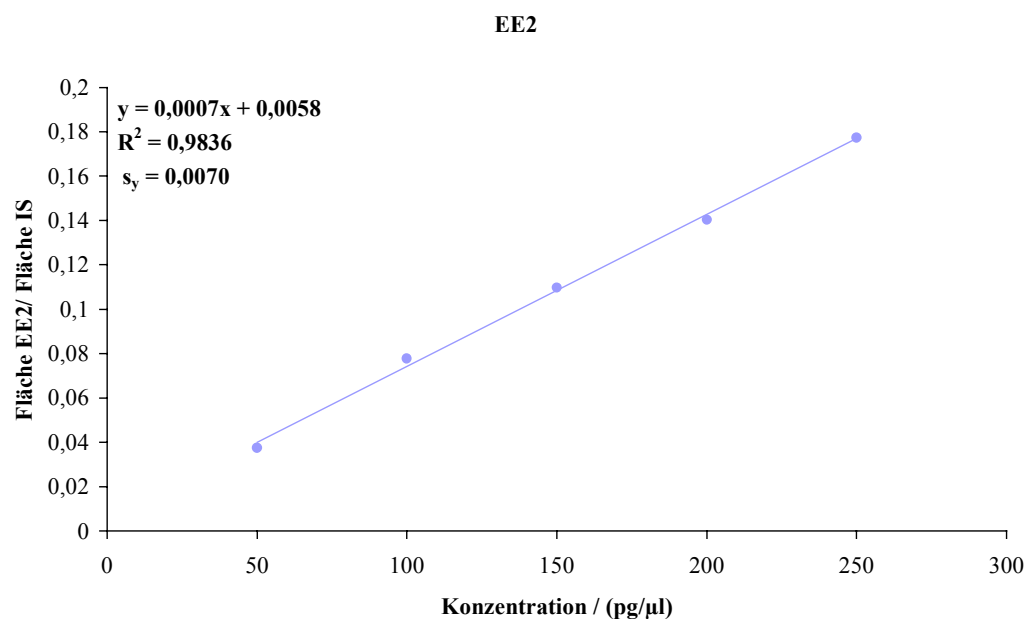


Abbildung 3.17c: Kalibriergerade für **Ethinylestradiol** als EE2-TMS(2): 50-250 pg/μl, (Estradiol- d_2 : 400 pg/μl), GC/MS (SIM): Quotient aus 425,2/418,2

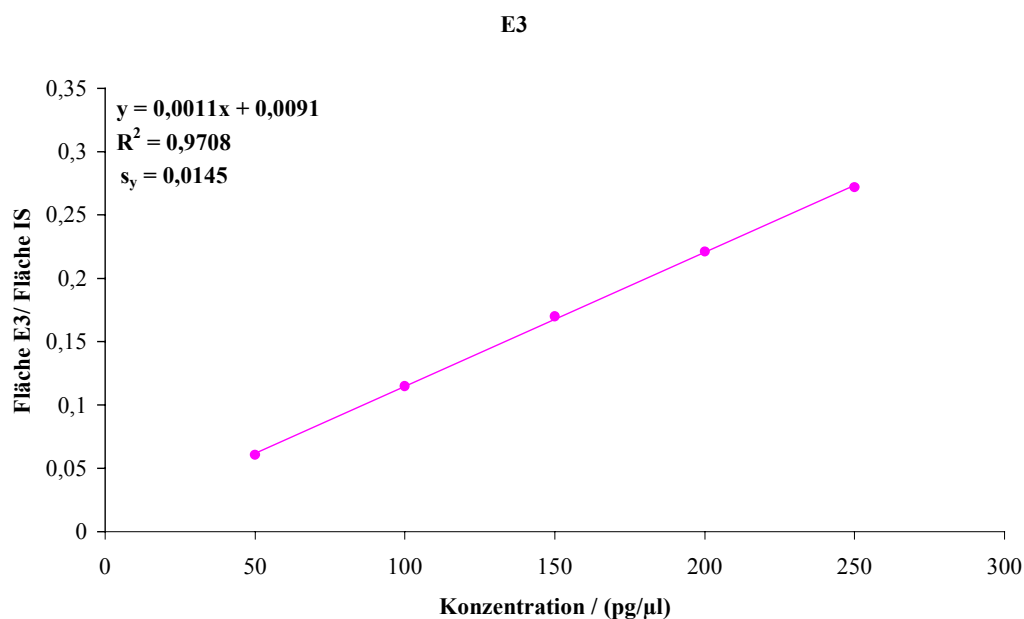


Abbildung 3.17d: Kalibriergerade für **Estriol** als E3-TMS(3): 50-250 pg/μl, (Estradiol- d_2 : 400 pg/μl), GC/MS (SIM): Quotient aus 504,35/418,2

3.4 FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (LIQUID LIQUID EXTRACTION, LLE)

3.4.1 OPTIMIERUNG DER PARAMETER

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) stellt im Vergleich zu den anderen im Rahmen der Arbeit eingesetzten Methoden der Probenvorbereitung die einfachste Technik dar. Die wässrige Probenlösung wird in einem Scheidetrichter mit einem organischen Lösemittel extrahiert und die organische Phase im Anschluss analysiert. Von Vorteil ist, dass die Zahl der zu optimierenden Parameter sehr überschaubar ist. Die Variationen beschränken sich praktisch auf das zur Extraktion eingesetzte Lösemittel sowie auf Zusätze und Veränderungen der Probenlösung.

Extraktionsmittel:

Da das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion auf der Verteilung der Analyten zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase beruht, sollte ein Lösemittel gewählt werden, dass einen großen Verteilungskoeffizienten für die Estrogene aufweist und diese auch möglichst selektiv extrahiert. Bei einer Verteilung stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen den Phasen ein, so dass für eine effektive Extraktion auch die

Zahl der Ausschüttelungen und das eingesetzte Volumen zu optimieren ist.

Probenlösung:

In Abhängigkeit der pK_s - bzw. pK_b -Werte der Analyte muss der pH-Wert der Probenlösung eingestellt werden, da nur ungeladene Verbindungen aus der wässrigen Phase extrahiert werden können.

Durch Salzzugabe kann man sich den sogenannten „Aussalzeffekt“ zunutze machen. Die Löslichkeit polarer Verbindungen im Wasser wird zurückgedrängt, so dass diese verstärkt in die lipophile Phase übertreten.

3.4.2 ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS HPLC

Da das Ziel der Probenvorbereitung sowohl in einer Anreicherung der Analyte als auch in einer entsprechenden Aufreinigung der Probe bestand, sollten die Ergebnisse nach LLE zunächst mittels HPLC überprüft werden. Vergleicht man die zur Analytik verwendeten Methoden der HPLC und GC, so ist eine Probenaufreinigung besonders für die HPLC essentiell. Aufgrund der geringeren Trennleistung im Vergleich zur GC und der geringeren Selektivität der UV- und elektrochemischen Detektion im Vergleich zur MS-Detektion, sind bei der HPLC-Bestimmung höhere Anforderungen an die Probenreinheit zu stellen.

Zur Überprüfung geeigneter Extraktionsbedingungen wurden jeweils 500 ml Probenlösung in einem Scheidetrichter von Hand ausgeschüttelt. Die Lösungen wurden in Aqua bidest. oder Abwasser durch Zugabe von Standardlösungen hergestellt. Die Konzentration der Probenlösungen betrug jeweils 2 µg/500 ml, es wurde kein interner Standard zugesetzt (siehe Arbeitsanweisung in 7.2). Die Untersuchungen erfolgten zunächst aus Aqua bidest. Um aber den Einfluss der Matrix auf die Probenvorbereitung zeigen zu können, wurden auch abwasserhaltige Proben ausgeschüttelt. Zur Herstellung solcher matrixhaltigen Probenlösungen stand allerdings keine echte Leermatrix zur Verfügung. Eine solche Leermatrix wäre ein Abwasser, das genauso zusammengesetzt ist wie die späteren Proben, allerdings keine Analyte enthält. Da aber die zur Optimierung eingesetzten Konzentrationen um ca. den Faktor 100 höher als die tatsächlich in realen Abwasserproben zu erwartenden Konzentrationen lagen, wurde der Fehler durch die Verwendung realen Abwassers als Matrix als gering angesehen. In Publikationen werden Matrixeinflüsse durch Huminstoffe auch durch den Einsatz technischer Huminsäure simuliert [JOHNSON, 1991]. Technische Huminsäure spiegelt allerdings nur sehr unzureichend die komplexe Zusammensetzung der Huminstoffe und deren Effekte auf die Probenvorbereitung wider.

Die Analytik der organischen Phase erfolgte nach Trocknen über Natriumsulfat, Eindampfen des Lösemittels und Wiederaufnahme in 2 ml Fließmittel durch HPLC unter Verwendung des GAT LCD 500 (UVD) bzw. des ESA Coulochem II (ELCD) (siehe Anlage A, 7.1.2.5). Zur quantitativen Bestimmung wurden externe Kalibrierkurven im Bereich von 2,5-12,5 ng/10 µl aufgenommen, was 25-125% der zur Probenvorbereitung eingesetzten Konzentration entsprach. Sollte zusätzlich eine Untersuchung mittels GC/MS erfolgen, so wurde die Probe nach dem Trocknen über Natriumsulfat geteilt. Die Messungen wurden in der Regel dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anhand der für den jeweiligen Tag aktuellen Kalibrierkurve ausgewertet. Auf die Angabe von Wertetabellen im Anhang wird verzichtet. Die Geräte und Arbeitsbedingungen sind im experimentellen Teil angegeben (7.1.2.2 und 7.1.2.5).

Die Beurteilung der Extraktreinheit bzw. der Abtrennung von Begleitstoffen erfolgte durch qualitativen Vergleich der Chromatogramme.

3.4.2.1 Extraktionsmittel

Als Lösemittel zur LLE der Estrogene wurden Dichlormethan, Chloroform, Ether, Ethylacetat, Hexan und Toluol auf ihre Eignung überprüft. Hierzu wurde zunächst von Aqua bidest. als Probenmatrix ausgegangen. Die Extraktionen erfolgten durch dreimaliges Ausschütteln mit 50 ml des jeweiligen Lösemittels. Die Analyse des Extraktes erfolgte mittels HPLC/UVD (208 nm) und -ELCD (450 mV).

Mit Dichlormethan, Chloroform und Ether konnten E1, E2 und EE2 mit 85-90% Wiederfindung extrahiert werden. Die Wiederfindungen für E3 lagen allerdings nur bei ca. 20%. Nach Etherextraktion war eine Bestimmung von E3 nicht möglich, da ein weiterer Peak mit gleicher Retentionszeit im Chromatogramm auftrat, der vermutlich aus dem Lösemittel selbst stammte. Die besten Ergebnisse bezüglich der Effektivität der Ausschüttelung wurden mit Ethylacetat erzielt. Hier lagen die Wiederfindungen für alle vier Estrogene bei rund 95%. Toluol und Hexan stellten dagegen keine geeigneten Extraktionsmittel dar. E3 war mit diesen nicht zu extrahieren und die Wiederfindungen für E1, E2 und EE2 lagen für Toluol nur bei ca. 50% und für Hexan noch darunter. Das Problem der schlechten Wiederfindung des Estriols hängt mit der bereits im Kapitel 3.3.1 diskutierten höheren Polarität des Moleküls im Vergleich zu den anderen Estrogenen, und der sich daraus ergebenden besseren Wasserlöslichkeit zusammen.

Ein erschwerender Faktor bei der Beurteilung der Messergebnisse war die starke Verunreinigung der Extrakte, die sich in vielen zusätzlichen Peaks im Chromatogramm äußerte. Da bis zu diesem Zeitpunkt nur mit bidestilliertem Wasser als Probenmatrix gearbeitet

wurde, mussten diese Verunreinigungen aus den Lösemitteln selbst stammen, und dies, obwohl nur hochreine Lösemittel speziell für die organische Rückstandsanalyse verwendet wurden (siehe 7.1.1 Chemikalien). Dazu muss allerdings angemerkt werden, dass mit 208 nm auch bei einer sehr unspezifischen Wellenlänge detektiert wurde. Die Messungen bei 280 nm und mit elektrochemischer Detektion lieferten jedoch auch keine wesentlich selektiveren Ergebnisse.

Da möglichst alle vier Estrogene mit einer Methode analysiert werden sollten, stellte Ethylacetat das am besten geeignete Lösemittel dar. Von Nachteil ist allerdings die recht gute Wassermischbarkeit des Ethylacetats, die stets zu Verlusten an Lösemittel und Analyt führt, und ebenso seine gegenüber Wasser niedrigere Dichte, die das Abtrennen der organischen Phase nach der Extraktion erschwert. Zum Vergleich wurde daher als zweites Lösemittel Dichlormethan in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen, obwohl dieses Estriol nur unzureichend zu extrahieren vermag. Es ist aber für den Einsatz zur LLE leichter zu handhaben als Ethylacetat.

Um die Verunreinigungen aus den Lösemitteln möglichst zu minimieren, wurden diese im Folgenden vor ihrer Verwendung frisch destilliert. Das pro Ausschüttelungsschritt eingesetzte Volumen wurde bei 50 ml belassen. Um zu überprüfen, inwieweit eine Mehrfachextraktion erforderlich ist, wurden Proben zum Vergleich ein-, zwei- bzw. dreimal mit jeweils 50 ml Lösemittel extrahiert. Die Wiederfindungen nach Zwei- und Dreifachextraktion unterschieden sich dabei praktisch nicht, so dass eine Zweifachextraktion vermutlich ausreichend gewesen wäre. Da dieses Ergebnis nicht durch Mehrfachmessungen abgesichert war, wurde im Folgenden immer eine Dreifachextraktion mit jeweils 50 ml Lösemittel durchgeführt.

3.4.2.2 Probenlösung

Der pH-Wert des zu untersuchenden Abwassers lag etwas oberhalb von pH 7 im neutralen Bereich. Um die Estrogene möglichst quantitativ aus der Probenlösung ausschütteln zu können, müssen diese in ungeladener Form vorliegen. Da der pK_s -Wert der Estrogene rund 10,7 beträgt (E1: 10,77; E2: 10,71 [LEWIS, 1979]), sind diese bei einem pH-Wert von 7 praktisch vollständig undissoziiert. Eine Erniedrigung des pH-Wertes ist daher zur Extraktion der Estrogene nicht erforderlich, es stellt sich nur die Frage, inwieweit dies eventuell die Selektivität der Anreicherung verbessern könnte. Unter Verwendung der beiden Extraktionsmittel Dichlormethan und Ethylacetat wurden daher Anreicherungen von dotierten Abwasserproben bei pH 3 und pH 7 durchgeführt. Die Ergebnisse für Dichlormethan sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3.18a-c).

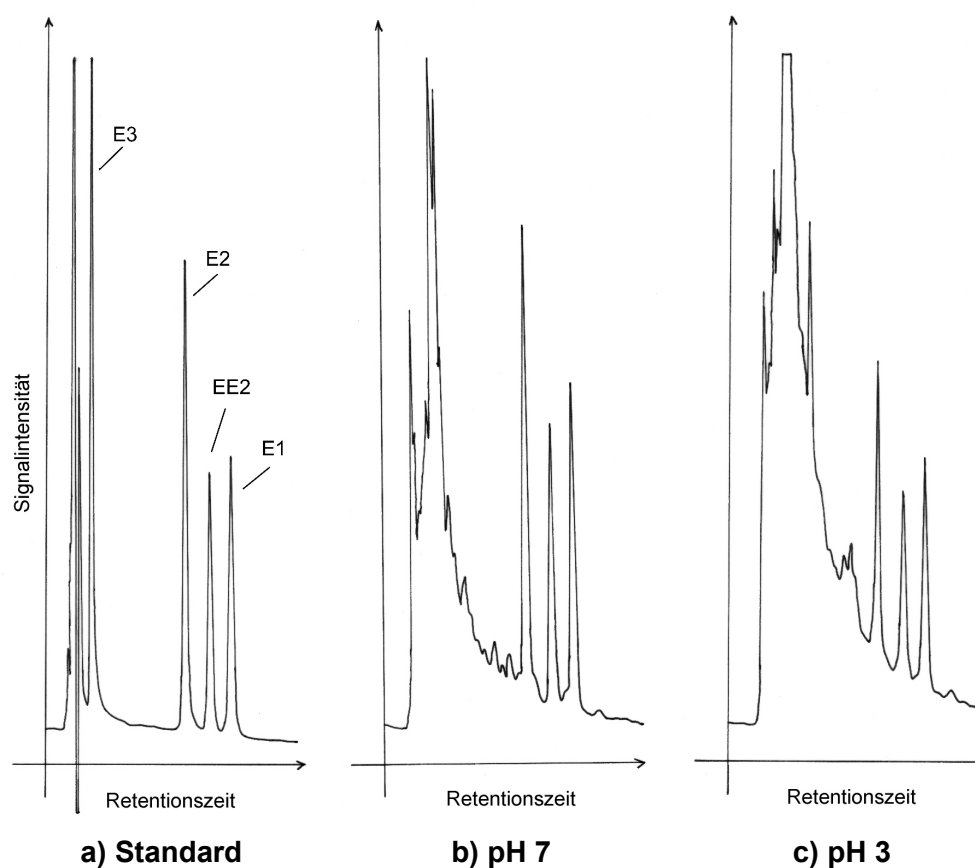


Abbildung 3.18a-c: Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan a) Standardlsg. zum Vergleich; b) Extraktion bei pH 7; c) Extraktion bei pH 3

Standard: 10ng/10µl E1, E2, EE2 und E3 in FM; LLE-Proben: 2µg/500ml E1, E2, EE2 und E3 in Abwasser; HPLC/ESA: 450mV

Wie aus der Abbildung zu ersehen, werden mit Dichlormethan bereits aus neutraler Lösung eine große Zahl von Matrixbestandteilen der Probe mit extrahiert, was sich aus saurer Lösung noch verstärkt. Die Verunreinigungen werden in der HPLC nur wenig retiniert und erscheinen als großer, nicht aufgelöster Peak zu Beginn des Chromatogramms. Dies macht eine Bestimmung des Estriols praktisch unmöglich. Die Quantifizierung der anderen Estrogene wird ebenfalls beeinträchtigt, da diese auf der abfallenden Flanke dieses Peaks sitzen.

Bei den coextrahierten Begleitstoffen handelt es sich um die in 2.2 angeführten Huminstoffe, die bereits nach dem Abdampfen der organischen Phase an einem gelblichen Rückstand im Kolben zu erkennen waren. Aufgrund ihrer gelblich-bräunlichen Färbung absorbieren die Huminstoffe Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich. Die Absorption nimmt jedoch im UV noch zu [HÜTTER, 1994], so dass sie hier mittels UV-Detektion mit erfasst wurden. Da die Huminstoffe auch phenolische Hydroxygruppen als Struktur-

elemente aufweisen, werden sie mittels ELCD ebenfalls detektiert. Um also eine Methode zur Spurenanalytik der Estrogene auf Basis der HPLC mit UV- oder elektrochemischer Detektion entwickeln zu können, ist eine Abtrennung der Huminstoffe unumgänglich. Da diese Abtrennung jedoch nicht im Rahmen der LLE erfolgte, sondern hierfür ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt erforderlich wäre, wurde diese Möglichkeit nicht weiter in Betracht gezogen. Die Proben wurden stattdessen noch einmal mittels GC/MS vermessen, um zu überprüfen, ob die fehlende Selektivität der Extraktion auch für die GC/MS-Bestimmung ein Problem darstellte.

Die Ausschüttelungen mit Ethylacetat führten aufgrund der höheren Polarität des Ethylacetates zu einer noch stärkeren Coextraktion der Huminstoffe.

3.4.3 LLE-GC/MS

Zur Gaschromatographie wurde die organische Phase zur Trockene abrotiert und der Rückstand mit 50 µl Derivatisierungsreagenz (MSTFA mit 0,1% TMSIM)³ wieder aufgenommen und umgesetzt. Die Messungen erfolgten am GC/MS im Scan- bzw. SIM-Modus (Anlage D, siehe 7.1.2.6).

Die Analyse einer mit Dichlormethan ausgeschüttelten dotierten Abwasserprobe (pH 3) lieferte im Scan-Modus das folgende, sehr komplexe Totalionenstromchromatogramm:

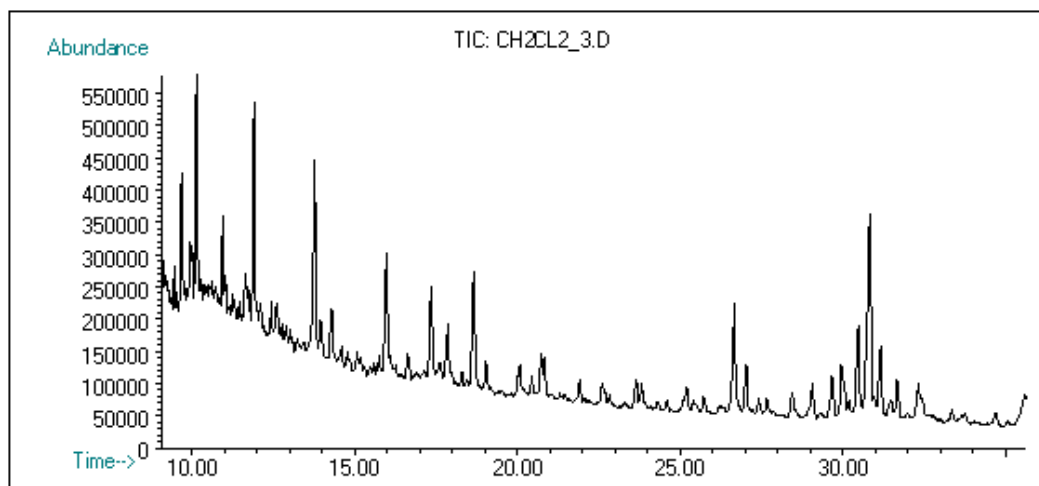


Abbildung 3.19a: 2 µg/500 ml E1, E2, EE2, E3 und *d*₂-E2 in Abwasser (pH 3), Extraktion mit CH₂Cl₂

Derivatisierung: MSTFA (0,1% TMSIM), GC/MS (Scan)

³ Die Reagenzmischung MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Nach Extraktion der charakteristischen Ionenspuren war es möglich, die zugesetzten Estrogene zu identifizieren:

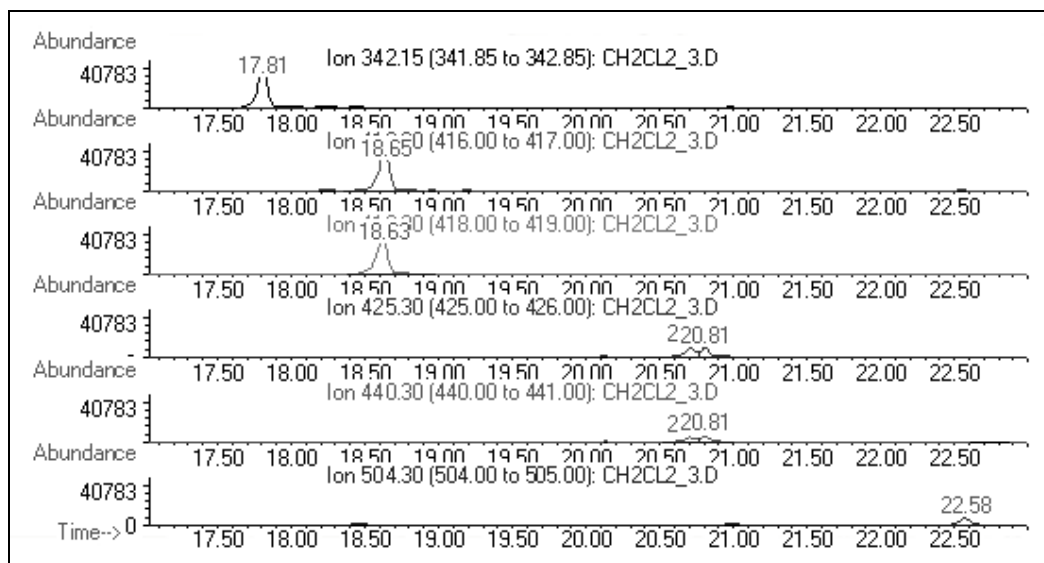


Abbildung 3.19b: Ionenspuren der Estrogene

E1-TMS=342.15 (Rt: 17.81min); E2-TMS(2)=416.30 (Rt: 18.65min); d₂-E2-TMS(2)=418.30 (Rt: 18.63min); EE2-TMS(2)=425.30 und 440.30 (Rt: 20.72min); E3-TMS(3)=504.30 (Rt: 22.58min)

Auffällig war allerdings der Doppelpeak für die Ionenspuren 425 und 440, die zur Auswertung von EE2 verwendet werden. Die folgende Abbildung zeigt dies noch einmal vergrößert:

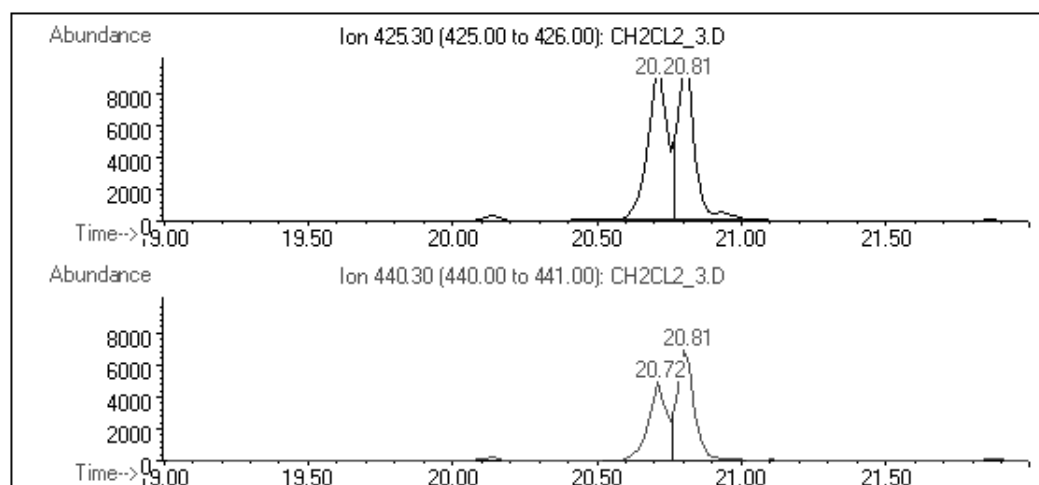


Abbildung 3.19c: Ionenspuren von EE2

Die gleichen Doppelpeaks wurden zum Teil auch bei Messungen nach Anreicherung über Festphasenextraktion oder Festphasenmikroextraktion beobachtet, was die Vermutung

nahe legte, dass es sich um ein Derivatisierungs- oder Injektionsproblem handeln könnte. Zunächst unabhängig davon wurden auch in Blindläufen recht große Peaks der Massen 425 und 440 detektiert, die auf eine Probenverschleppung von EE2 hindeuteten.

Die Ursache dieser Beobachtungen fand sich nach genauerer Auswertung des TICs aus Abb. 3.19a. Der Peak mit der Retentionszeit 20.81 min lieferte das folgende Massenspektrum.

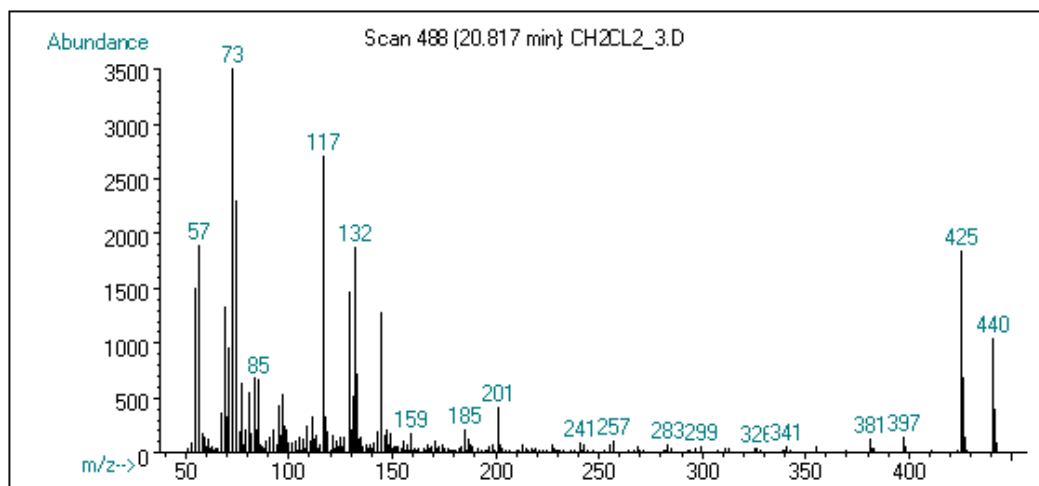


Abbildung 3.19d: Massenspektrum des Peaks der Retentionszeit 20.81 min

Vergleicht man das erhaltene Spektrum mit dem des silylierten Ethinylestradiols, so sind zwar auch hier die Massen 425 und 440 vorhanden, es fehlen allerdings die Massenfragmente im Bereich von m/z 150-300 (siehe Abb. 8.10 im Anhang). Demnach handelte es sich bei dem beobachteten Peak nicht um EE2, sondern um eine andere Verbindung mit fast identischer Retentionszeit.

Die Auswertung der TICs nach SPE oder SPME lieferte kein so deutliches Massenspektrum der unbekannten Substanz, da diese dort offensichtlich nur in wesentlich niedrigerer Konzentration auftrat.

Durch Bibliothekssuche und Spektrenvergleich konnte das unbekannte Massenspektrum der trimethylsilylierten Lignocerinsäure (Tetracosansäure, $C_{24}H_{48}O_2$) zugeordnet werden. Zur Absicherung dieser Vermutung wurde Lignocerinsäure derivatisiert und injiziert. Das TIC mit zugehörigem Spektrum ist in Abb. 3.20a/b angegeben. Lignocerinsäure weist die gleiche Retentionszeit und auch das gleiche Spektrum wie die unbekannte Substanz auf, was als Beweis der Übereinstimmung der beiden Verbindungen angesehen wurde. Da die Retentionszeitdifferenz zwischen Lignocerinsäure und EE2 nur 0.09 min beträgt und die Auswertung des EE2 meist über die Massen 425 und 440 erfolgte, wurde die Lignocerinsäure in den vorhergehenden Messungen teilweise versehentlich für EE2 gehalten.

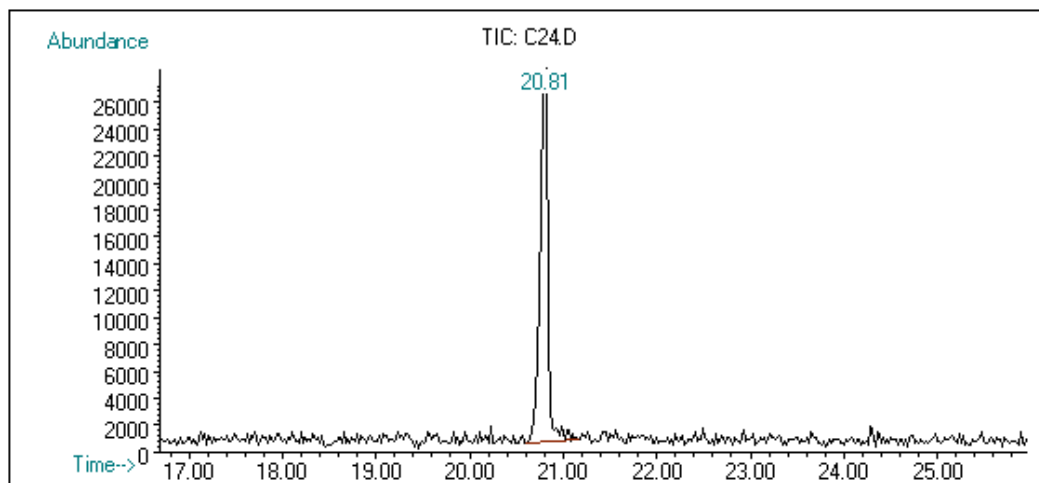


Abbildung 3.20a: Lignocerinsäure-TMS (Scan)

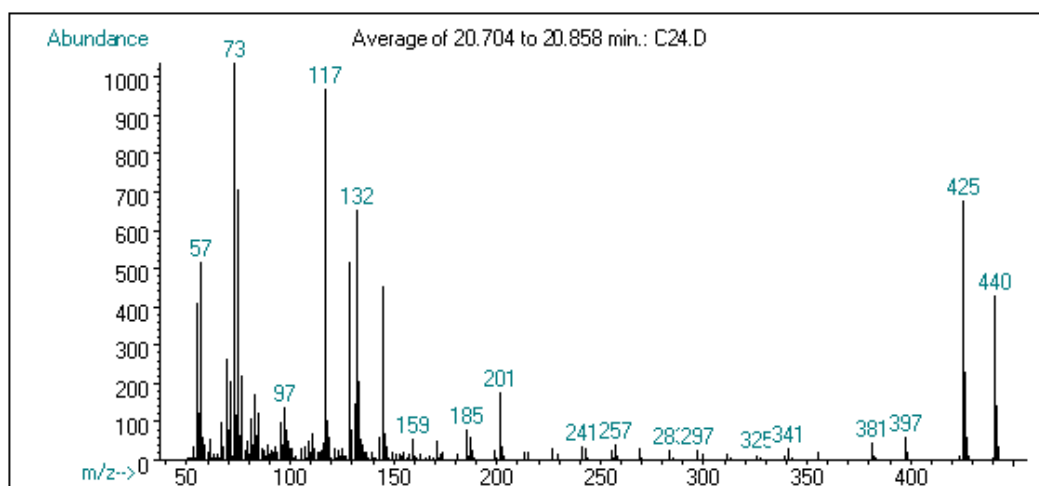


Abbildung 3.20b: Massenspektrum Lignocerinsäure-TMS

Die Lignocerinsäure gehört neben der Cerotinsäure ($C_{26}H_{52}O_2$) zu den gesättigten, überlangen Fettsäuren, die relativ selten in der Natur vorkommen. Sie sind Bestandteil der Cerebroside und Sphingomyeline im tierischen Organismus, sind aber auch in kleinen Mengen (0,2-1%) in vielen natürlichen Ölen und Fetten als Bestandteil der Glyceride enthalten [HÄNSEL, 1999]. Letzteres ist wahrscheinlich auch die Erklärung für das Vorkommen der Lignocerinsäure in den vermessenen Proben. Gerade die im Rahmen der Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeiteten Proben zeigten nach Messung im Scan eine Vielzahl von Fettsäuren, wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure, im Chromatogramm. Diese wurden wahrscheinlich ebenso wie die Lignocerinsäure durch Verunreinigungen der Lösemittel oder Derivatisierungsmittel eingeschleppt bzw. eventuell auch aus

der Probenlösung mit extrahiert. Die anderen genannten Fettsäuren stören die Bestimmung der Estrogene jedoch nicht, da sie kürzere Retentionszeiten aufweisen und in der MS deutlich andere Fragmente als die Estrogene bilden.

In der Literatur wird auch von anderen Autoren über Probleme bei der Ethinylestradiol-Bestimmung durch eine koeluierende Verunreinigung geschrieben. So berichtet z.B. Ternes von einer ihm unbekannten Verbindung, die im Massenspektrum mit $m/z=425$ und $m/z=440$ die gleichen Fragmente wie EE2 liefert. Da er mittels MS/MS detektierte, konnte er zur Bestimmung trotzdem die Masse 425 als Mutterion einsetzen, die Quantifizierung erfolgte dann anhand von Tochterionen, die nur im Spektrum von EE2 vorkommen. Ternes schließt jedoch nicht aus, dass in einer früheren Publikation (STUMPF, 1996) aufgrund dieser koeluierenden Verunreinigung möglicherweise zu hohe EE2-Gehalte publiziert wurden [TERNES, 1999]. Holtey-Weber schreibt ebenfalls von einer unbekannten Verbindung, die die gleiche Retentionszeit wie EE2 und auch die Massen 425 und 440 aufweist. Er postuliert, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung aus dem verwendeten Derivatisierungsreagenz Sylon BTZ handele [HOLTEY-WEBER, 2001]. Bei beiden Autoren trat die Verunreinigung zu exakt der gleichen Retentionszeit wie EE2 auf, was in den eigenen Untersuchungen so zunächst nicht beobachtet wurde. Ein Säulenwechsel von der HP-5 MS zur Restek Rtx 5 offenbarte jedoch das gleiche Problem. Eine Trennung von Lignocerinsäure und EE2 war an der neuen Restek-Säule erst nach einer Änderung des GC-Temperaturprogrammes möglich (siehe 7.1.2.6). Sowohl Ternes als auch Holtey-Weber geben in ihren Publikationen Massenspektren der unbekannten Verunreinigung an. Es konnten aber weder zwischen deren Spektren noch mit dem eigenen Spektrum eindeutige Übereinstimmungen gefunden werden, so dass nur vermutet werden kann, dass es sich bei Ternes und Holtey-Weber ebenfalls um die Lignocerinsäure als Verunreinigung handelte.

3.4.4 QUANTITATIVE BESTIMMUNG NACH LLE

Da mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nur eine unzureichende Abtrennung der Matrixbestandteile gelang, wurde die LLE als Methode zur Anreicherung der Estrogene nicht weiter in Betracht gezogen. Ohne einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt sind die benötigten Bestimmungsgrenzen zumindest durch HPLC-Analyse nicht zu realisieren und auch der GC sollte nicht mehr als unbedingt nötig durch Verunreinigungen kontaminiert werden. Für eine quantitative Bestimmung ist außerdem die relative schlechte Präzision der Methode von Nachteil, die allerdings durch die Verwendung eines automatisierten Systems bzw. durch Zugabe eines internen Standards verbessert werden könnte.

3.4.5 SORBENSGESTÜTZTE FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION (SUPPORTED LIQUID LIQUID EXTRACTION, SLLE)

Bei der sorbengestützten Flüssig-Flüssig-Extraktion (z.B. Extrelut® der Firma Merck) wird die wässrige Phase zunächst auf eine Kieselgur-Matrix aufgebracht, bevor im Anschluss daran die Extraktion mit einem organischen Lösemittel erfolgt. Es sollte geprüft werden, inwieweit das zusätzliche Trägermaterial einen Vorteil bezüglich der Abtrennung von Verunreinigungen, insbesondere der Huminstoffe, bietet.

3.4.5.1 Optimierung der Parameter

Die zu optimierenden Versuchsbedingungen betreffen wie bei der LLE die Wahl des Extraktionsmittels und die Eigenschaften der Probenlösung (siehe 3.4.1), hinzu kommt noch die Menge an eingesetztem Sorbens. Bei Verwendung fertig gefüllter Extrelut-Säulen bzw. fertig abgepackter Nachfüllbeutel entfällt dieser Punkt, da die Füllmenge bereits der Sorbenskapazität angepasst ist.

3.4.5.2 Überprüfung der Parameter mittels HPLC

Es wurde mit 20 ml-Extrelutsäulen gearbeitet, die aus Nachfüllbeuteln gepackt wurden. Die Konzentration der Probenlösung betrug für E1, E2, EE2 und E3 jeweils 2 µg/20 ml in Aqua bidest.. Es wurde kein interner Standard zugesetzt. Nach Elution der Säule mit 40 ml Lösemittel wurde dieses abrotiert, der Rückstand in 2 ml Fließmittel aufgenommen und mit HPLC/UVD bzw. ELCD analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung im Bereich von 2,5-12,5 ng/10 µl, was 25-125% der eingesetzten Ausgangskonzentration entsprach. Die Extraktionen erfolgten manuell. Die Arbeitsbedingungen und Geräteparameter sowie die Arbeitsanweisungen zur Herstellung der Lösungen und Durchführung der Extraktion sind dem experimentellen Teil zu entnehmen (7.1.2.2; 7.1.2.6 und 7.2).

Extraktionsmittel

Als Lösemittel kamen wie bei der klassischen LLE Dichlormethan, Chloroform, Ether, Ethylacetat, Hexan und Toluol zum Einsatz. Es zeigte sich auch hier, dass Ethylacetat und Dichlormethan für die Extraktion der Estrogene am besten geeignet sind. Die Wiederfindungen mit Angabe der Variationskoeffizienten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 3.1: Wiederfindung und Präzision nach sorbensgestützter Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Extrelut

2 µg/20 ml E1, E2, EE2 und E3 in Aqua bidest., HPLC/ELCD: 450 mV (ESA), n=5

		E1	E2	EE2	E3
Dichlormethan	Wiederfindung	94,0%	93,7%	92,7%	59,2%
	Vk	2,1%	2,4%	2,8%	7%
Ethylacetat	Wiederfindung	87,6%	86,7%	86,5%	80,5%
	Vk	1,7%	2,1%	2,0%	3,4%

Die Ergebnisse der Anreicherung aus Aqua bidest. sahen aufgrund der hohen Wiederfindung und guten Präzision zunächst sehr vielversprechend aus. Daraufhin durchgeführte Extraktionen aus Abwasser mit der gleichen Estrogenkonzentration ergaben ein vergleichbares Ergebnis. Matrixstörungen wurden praktisch nicht beobachtet. Es muss allerdings einschränkend angemerkt werden, dass die hier eingesetzten Konzentrationen aufgrund des kleinen Probevolumens von 20 ml sehr hoch gewählt waren. Sie lagen mindestens um den Faktor 1000 über den tatsächlich im Abwasser zu erwartenden Konzentrationen.

Probenlösung

Eine Erniedrigung der Konzentration der Probenlösung auf 20 ng/20 ml, d.h. um den Faktor 100, führte bereits nach Anreicherung aus bidestilliertem Wasser zu Problemen bei der HPLC-Bestimmung. Es wurden viele zusätzliche Peaks im Chromatogramm detektiert.

Ausgehend von der gleichen Konzentration, diesmal allerdings in 1 l Probe (1 µg/l), wurden daraufhin abwasserhaltige Proben extrahiert. Es sollte die Fähigkeit des Extrelut zur Abtrennung der Huminstoffe aus den Abwasserproben geprüft werden. Da zur Anreicherung von 1000 ml Probenvolumen aber auch ca. 1000 g Sorbens benötigt werden und ebenfalls ein entsprechend großes Volumen an Lösemittel zur Elution nötig ist, wurde aus Kostengründen ein anderer Weg eingeschlagen. Die dotierten Abwasserproben wurden am Rotationsverdampfer zunächst auf 20 ml eingeeengt, das Konzentrat dann über eine 20 ml-Extrelutsäule gegeben und mit Dichlormethan bzw. Ethylacetat eluiert. Die Chromatogramme zeigten auch hier, wie bei der klassischen LLE, einen riesigen Peak zu Beginn des Analysenlaufes, so dass ohne einen weiteren Aufreinigungsschritt eine Bestimmung der Estrogene im Spurenbereich nicht möglich gewesen wäre. Aufgrund der relativ aufwendigen Aufkonzentrierung und der schlechten Abtrennung der Matrixbestandteile wurden keine weiteren Versuche zur Anreicherung über Extrelut durchgeführt.

3.5 FESTPHASENEXTRAKTION (SOLID PHASE EXTRACTION, SPE)

3.5.1 OPTIMIERUNG DER PARAMETER

Bei einer Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion (SPE) werden die folgenden Analysenschritte durchlaufen, wovon Punkt 3.) als optional anzusehen ist:

- 1.) Konditionierung des Sorbens
- 2.) Aufgabe bzw. Durchsaugen der Probenlösung
- 3.) Waschen des Sorbens
- 4.) Trocknen des Sorbens
- 5.) Elution des Analyten

Die entsprechende Wahl der jeweiligen Versuchsbedingungen hängt von den Eigenschaften der Analyten und der Probenzusammensetzung ab. Es bedarf daher der Optimierung der folgenden Parameter:

Sorbens/Festphase:

Die Auswahl des Sorbens erfolgt zunächst anhand der chemischen Struktur und Eigenschaften der Analyte. Diese sollen von der Festphase möglichst effektiv zurückgehalten werden, d.h. die Anreicherung bzw. Wiederfindung soll möglichst hoch sein.

Außerdem sollte die Selektivität des Sorbens für die Zielanalyte möglichst groß sein, um Matrixbestandteile und Störkomponenten abzutrennen. Als Sorbentien werden meist Materialien eingesetzt, die auch in der Chromatographie Verwendung finden, so dass Informationen zur Sorbensauswahl oft direkt aus chromatographischen Daten gewonnen werden können.

Als weiteres Kriterium ist die Kapazität der Festphase, und damit die benötigte Menge an Sorbens, zu beachten. Sie hängt nicht nur von der Analytkonzentration, sondern auch ganz wesentlich von den Begleitstoffen der Probe ab. Diese können die Sorbenskapazität stark mindern. Die Sorbensmenge wird daher in der Regel nicht von der Analytkonzentration, sondern vom anzureichernden Probenvolumen bestimmt.

Probenlösung:

Auch hier ist wie bei der LLE der pH-Wert der Lösung in Abhängigkeit der pK_s - bzw. pK_b -Werte der Analyte einzustellen, um eine effektive Wechselwirkung mit der Festphase zu ermöglichen. Soll die Anreicherung z.B. an einem RP18-Sorbens erfolgen, dann müssen die Analyte ungeladen in der Probenlösung vorliegen. Es muss jedoch die pH-Stabilität des Sorbens beachtet werden.

Ein Zusatz von Salz zur Probenlösung kann die Anreicherung der Analyte über einen Aussalzeffekt begünstigen.

Auch durch Zusatz eines organischen Lösemittels kann die Effektivität der SPE verbessert werden. Ein geringer Lösemittelanteil in der Probenlösung gewährleistet eine dynamische Solvatisierung des Sorbens, was besonders für Umkehrphasen wichtig ist, damit es nicht zu einem Kollabieren der lipophilen Ketten kommt.

Ein weiterer Optimierungspunkt ist die Fließgeschwindigkeit, d.h. die Geschwindigkeit, mit der die Probenlösung durch die Kartusche gesaugt wird. Diese sollte so gewählt werden, dass eine effektive Wechselwirkung zwischen Analyt und Sorbens möglich ist, jedoch auch größere Probenvolumina noch in angemessener Zeit angereichert werden können.

Waschschritte:

Waschschritte dienen dazu, auf der Festphase mit angereicherte Begleitstoffe vor der Elution des Analyten zu entfernen. Zum Waschen werden Lösemittel oder Lösemittelgemische eingesetzt, in denen der Analyt nicht löslich ist bzw. mit denen er sich gerade noch nicht vom Sorbens eluieren lässt. Die Erfordernisse an die Eluatreinheit hängen dabei von der im Anschluss an die Probenvorbereitung verwendeten Analysenmethode ab. Ist die Selektivität der eingesetzten Detektion hoch, wie z.B. bei der MS-Detektion, kann u.U. auch vollständig auf Waschschritte verzichtet werden.

Trocknung:

Um ein wasserfreies Eluat zu erhalten, ist es erforderlich, dass das Sorbens vor der Elution getrocknet wird. Dies kann durch Durchsaugen von Luft oder Inertgas oder aber auch durch Vakuum- oder Gefriertrocknung erfolgen.

Elutionsmittel:

Das zur Elution verwendete Lösemittel muss ausreichend elutionsstark sein, um die Wechselwirkung zwischen Analyt und Sorbens zu durchbrechen. Zusammen mit der Wahl einer geeigneten Festphase ist das Elutionsmittel entscheidend für die Effektivität der Anreicherung. Da die Analyte möglichst vollständig aus der Kartusche eluiert werden sollen, ist auch das Volumen des Elutionsmittels zu optimieren. Falls das Eluat im Anschluss noch weiter eingeeengt werden soll, sollte auf die Flüchtigkeit des verwendeten Lösemittels geachtet werden.

3.5.2 ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS HPLC

Die Ergebnisse wurden auch hier wieder aus den gleichen Gründen wie bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels HPLC überprüft (siehe 3.4.2).

Aus Zeitgründen wurde für die Optimierungsversuche zunächst von Probenvolumina von 100 ml ausgegangen. Die Probenlösungen wurden in Aqua bidest. bzw. Abwasser als Matrix angesetzt, die Konzentration der Estrogene betrug jeweils 1 µg/100 ml. Die Anreicherung erfolgte mit Hilfe einer Vakuum-Absaugeinheit. Die Eluate wurden mittels HPLC unter Verwendung des GAT LCD 500 (UVD) bzw. des ESA Coulochem II (ELCD) vermessen. Zur quantitativen Bestimmung wurden externe Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 5-12 ng/10 µl durchgeführt, was 50-120% der eingesetzten Analysenkonzentration entsprach. Um den Einfluss der Matrix zu zeigen, wurden dotierte Abwasserproben angereichert. Der Fehler durch die Verwendung des realen Abwassers wurde als zu vernachlässigen angesehen, da auch hier die Konzentrationen in der Probenlösung die tatsächlich zu erwartenden Konzentrationen um ein Vielfaches (ca. Faktor 100) übertrafen. Auf die Angabe von Wertetabellen im Anhang wurde verzichtet. Die Arbeitsanweisungen zur Herstellung der Anreicherungslösungen und Durchführung der Anreicherung (7.2), sowie die verwendeten Geräte und Arbeitsbedingungen sind dem experimentellen Teil zu entnehmen (7.1.2.3 und 7.1.2.5).

3.5.2.1 Auswahl des Sorbens

In Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Kartuschen, gefüllt mit unterschiedlichen Sorbentien diverser Hersteller, auf ihre Eignung zur Anreicherung der Estrogene geprüft (siehe Tab. 7.1 „Sorbensauswahl“). Als Probenmatrix wurde Aqua bidest. eingesetzt.

Die Messungen ergaben, dass besonders RP18-Phasen und Styren-Divinylbenzen-Sorbentien (SDB) zur Anreicherung der Estrogene geeignet sind. Die mit diesen Festphasen erzielten Wiederfindungsraten lagen für E1, E2 und EE2 im Bereich von 70-99%. Die Wiederfindungen für E3 waren jeweils etwas niedriger, was wieder auf die höhere Polarität des Estriols im Vergleich zu den anderen Estrogenen zurückzuführen ist.

Die gleichen Untersuchungen mit Abwasser als Matrix ergaben ähnliche Wiederfindungsraten für E1, E2 und EE2, zumindest konnte für die hier angereicherte Konzentration von 1 µg/100 ml keine verminderte Kapazität des Sorbens durch Matriceinflüsse beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Bestimmung des Estriols aus Abwasser auch mittels Festphasenextraktion problematisch werden würde, da, wie bei der LLE, eine große Zahl von Matrixkomponenten mit extrahiert wurde. Diese zeichneten sich bereits bei der Anreicherung als grünlich-bräunlicher Rand im oberen Teil der SPE-Kartuschen

ab. Bei den mit angereicherten Begleitstoffen handelte es sich wieder um die bereits beschriebenen Huminstoffe, die, wie in der Abbildung zu sehen, in der anschließenden HPLC als großer Peak direkt zu Beginn des Chromatogramms eluiert wurden.

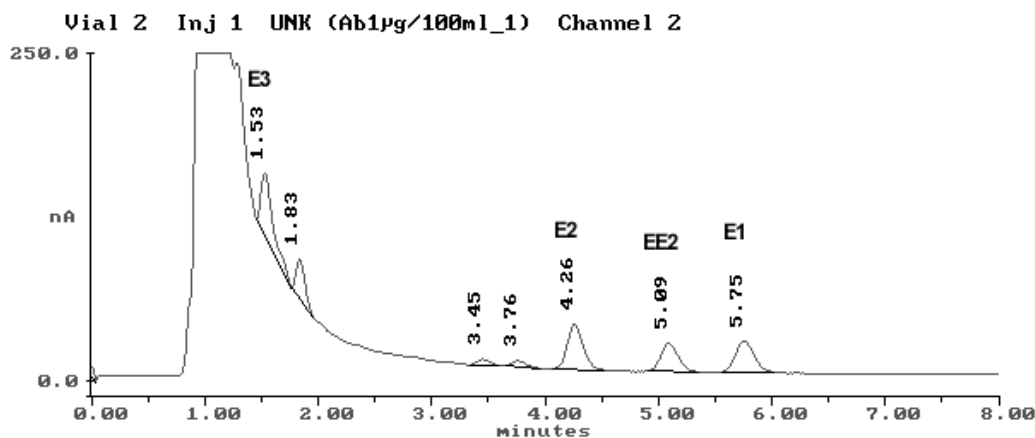


Abbildung 3.21: 1 µg/100 ml Abwasser, LiChrolut RP18 1 g, Elution mit MeOH, ESA 450 mV

Um die Huminstoffe bereits möglichst während der Festphasenextraktion abzutrennen, wurde für die RP18-Phasen im Folgenden der Einsatz anderer Elutionsmittel als Methanol, sowie die Einführung zusätzlicher Wasch- und Aufreinigungsschritte erprobt.

Die SDB-Phasen boten bezüglich der Abtrennung der Begleitstoffe praktisch keine Vorteile gegenüber den RP18-Phasen und wurden daher nicht weiter verwendet.

Außer der Störung durch die Huminstoffe stellte bei der SPE auch die relativ schlechte Wiederfindung von Estriol ein Problem dar. Da die entwickelte Methode die parallele Bestimmung aller vier Estrogene ermöglichen sollte, wurde in die Untersuchungen ein weiteres Festphasenmaterial mit einbezogen. Nicht poröser, graphitisierter Kohlenstoff (graphitized carbon black, GCB) ist aufgrund seiner Oberflächenbeschaffenheit besonders gut zur Anreicherung polarer Verbindungen aus Wasser geeignet. GCB-Sorbentien weisen an ihrer Oberfläche sowohl unpolare, graphitähnliche Strukturen als auch polare funktionelle Gruppen auf, so dass sie als RP-Phase, Normalphase, aber auch als Ionenaustauscher fungieren können [HENNION, 2000], [MATISOVA, 1995]. Aus dem Bereich der Umweltanalytik gibt es bereits einige Publikationen, in denen GCB erfolgreich zur Anreicherung der Estrogene eingesetzt werden konnte [LAGANA, 2000], [BARONTI, 2000], [JOHNSON, 2000].

Für die eigenen Untersuchungen wurde Carbograph 1 von Alltech als GCB-Sorbens verwendet. Die Konzentration der Probenlösung betrug wie bei den vorhergehenden SPE-

Anreicherungen 1 µg/100 ml. Die erzielten Ergebnisse waren jedoch enttäuschend. Trotz vielfältiger Variationen des Elutionsmittels (Methanol, Acetonitril, Dichlormethan, Chloroform, Mischungen aus Methanol/Dichlormethan, Dioxan) und der Elution in Richtung der Probenaufgabe und auch entgegen („Backflush“), gelang maximal eine 50%ige Elution der aufgegebenen Stoffmenge. Die Wiederfindung war hierbei auch stark von der eingesetzten Ausgangskonzentration der Probenlösung abhängig, denn bei einer Konzentration von 10 µg/100 ml lag sie deutlich höher als bei 1 µg/100 ml. Auch die direkte Übertragung der in den genannten Veröffentlichungen beschriebenen Anreicherungs- und Elutionsbedingungen ergab keine besseren Wiederfindungen.

Die Erklärung dafür liegt wahrscheinlich in der Oberflächenbeschaffenheit des Kohlenstoff-Sorbens. GCB enthält an seiner Oberfläche auch Hydrochinongruppen, die eine irreversible Chemisorption mit Analyten eingehen können [HENNION, 2000]. Dass dieses Problem jedoch nur in den eigenen Untersuchungen und nicht in den oben genannten Publikationen zur Estrogenanalytik auftrat, lag wahrscheinlich daran, dass dort andere GCB-Sorbentien verwendet wurden. Lagana et al. benutzten Envi-Carb von Supelco [LAGANA, 2000] und Baronti et al. und Johnson et al. Carbograph 4 von Lara (Italien) [BARONTI, 2000], [JOHNSON, 2000]. Die verwendeten Sorbentien unterscheiden sich zunächst in der Größe ihrer Oberfläche. Carbograph 1 und Envi-Carb haben eine Oberfläche von 100 m²/g und Carbograph 4 von 210 m²/g. Die stärksten Probenverluste sollten daher eigentlich beim Carbograph 4 auftreten. Vermutet wird hier allerdings, dass die Beschaffenheit der Oberflächen, und damit die Art und Zahl der funktionellen Gruppen, von Sorbens zu Sorbens bzw. wahrscheinlich auch bereits von Charge zu Charge unterschiedlich sind, so dass dadurch das Ausmaß der Anreicherung und der irreversiblen Chemisorption durchaus stark variieren kann.

Da die GCB-Sorbentien keine Vorteile gegenüber den RP18-Phasen boten, wurde für die weiteren Untersuchungen nur noch mit Letzteren gearbeitet. Für die Optimierungsversuche wurde dabei stets von selbst gefüllten SPE-Kartuschen ausgegangen, die mit 1 g LiChrolut RP18 bepackt wurden. Da bei Anreicherungen sehr niedriger Konzentrationen Probenverschleppungen beobachtet wurden, wurden für solche Proben und für Realproben Einmalkartuschen verwendet. Hierfür standen die Waters tC 18 Fertigkartuschen zur Verfügung. Das tC 18-Sorbens unterscheidet sich vom LiChrolut RP18 zwar durch ein Endcapping (siehe Tab. 7.1), doch hatte dieses auf die Wiederfindungsraten in den Versuchen zur Sorbensauswahl praktisch keinen Einfluss.

Die Ermittlung der Sorbenskapazität ist in 3.5.2.4. beschrieben.

3.5.2.2 Probenlösung

Die zur Optimierung eingesetzten Probenlösungen der Konzentration $1\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ enthielten jeweils einen Methanolanteil von 1% (V/V), der durch das Dotieren mit Standardlösungen zustande kam. Da die Estrogene nur sehr schlecht wasserlöslich sind, mussten zunächst methanolische Standardlösungen hergestellt werden, von denen entsprechende Anteile der Probenlösung zugesetzt wurde. Die in späteren Untersuchungen verwendeten größeren Probenvolumina der Konzentration $1\text{ }\mu\text{g}/1\text{ l}$ wurden in gleicher Weise hergestellt, so dass der Methanolgehalt dort nur noch 0,1% (V/V) betrug (siehe 7.2). Inwieweit dies eine Änderung der dynamischen Solvatisierung des Sorbens bewirkte, wurde nicht systematisch überprüft. Für alle Messungen wurde aber stets sichergestellt, dass das Sorbens zwischen Konditionierung und Anreicherung, sowie auch während der Anreicherung selbst, nicht trocken lief.

Die Anreicherungslösung wurde nicht auf einen bestimmten pH eingestellt, sondern es wurde lediglich überprüft, ob der pH-Wert im Bereich von 6-8 lag. Von anderen Autoren wird die Anreicherung der Estrogene aus saurer Lösungen durchgeführt [STUMPF, 1996], [SPENGLER, 1999], was aber, wie bereits bei der LLE diskutiert, nur zu einer verstärkten Mitanreicherung der Huminstoffe führte.

Eine Optimierung der Fließgeschwindigkeit der Probenlösung war aufgrund der Verwendung einer manuellen Absaugeinheit nicht möglich, da an dieser keine konstanten Flussraten vorgegeben werden konnten. Es wurde dennoch versucht, eine mittlere Fließgeschwindigkeit von ca. 8 ml/min einzuhalten, so dass eine Anreicherung von 1 l Probenlösung ca. zwei Stunden dauerte.

3.5.2.3 Auswahl des Elutionsmittels

Als Lösemittel zur Elution des Sorbens wurde zunächst Methanol eingesetzt, da die Estrogene in Methanol recht gut löslich sind. Wie aber bereits in 3.5.2.1 gezeigt, werden bei der Extraktion von Abwasserproben viele organische Begleitstoffe am Sorbens mit angereichert und mit Methanol dann auch in das Eluat überführt. Man erhält einen stark braun gefärbten Extrakt, der sowohl nach UVD als auch nach ELCD ein Chromatogramm entsprechend der Abb. 3.21 liefert. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurden weitere Lösemittel auf ihre Elutionsstärke und Selektivität zur Elution der Estrogene geprüft.

Die Verwendung von Aceton, Acetonitril und Ethylacetat brachte einen deutlichen Selektivitätsgewinn. Der Peak der koeluierten Huminstoffe verkleinerte sich, die Wiederfindung der Estrogene blieb aber in etwa im gleichen Bereich wie nach Methanol-Elution.

Der Übergang zu unpolareren Lösemitteln wie Hexan, Toluol, Dichlormethan oder Chloroform hatte keine Vorteile, neben der erwünschten Verringerung der Begleitstoffe ging die Wiederfindung der Estrogene stark zurück, und eine Bestimmung von Estriol war mit diesen Elutionsmitteln gar nicht möglich.

Für die weiteren SPE-Anreicherungen wurde Aceton als Elutionsmittel ausgewählt. Da aber dadurch das Problem der Huminstoffe noch nicht vollständig eliminiert werden konnte, mussten weitere Aufreinigungsschritte erprobt werden.

Zur Ermittlung des benötigten Elutionsvolumens wurden Kartuschen mit Volumina von 2, 4, 6, 8 und 10 ml Aceton eluiert. Ab einem Volumen von 4 ml konnte praktisch keine Peakflächenzunahme mehr beobachtet werden, so dass hier von einer vollständigen Elution ausgegangen wurde.

3.5.2.4 Abtrennung von Matrixbestandteilen

Die folgenden Techniken wurden zur Aufreinigung des Eluates getestet:

- Waschen des Sorbens nach der Anreicherung
- Anreicherung über zwei Kartuschen direkt in Folge
- Clean-Up des Eluates im Anschluss an die SPE

Als Anreicherungs volumen wurde jetzt von 1 l Probelösung angesetzt in Abwasser ausgegangen, um eine Matrixbelastung entsprechend der Anreicherung von 1 l Realprobe zu simulieren. Die Konzentration der Estrogene betrug jeweils 1 µg/l l.

Waschen des Sorbens

Da es sich bei den Huminstoffen wie bei den Estrogenen um Verbindungen mit phenolischen OH-Gruppen handelt, wurde eine Abtrennung aufgrund von pH-Veränderungen nicht in Betracht gezogen. Es wurde vielmehr versucht, die Elutionsstärke des Methanols, welches ja auch die Verunreinigungen zu eluieren vermag, durch Wasserzusatz entsprechend zu reduzieren, um eine Differenzierung zwischen Begleitstoffen und Analyten zu erreichen.

Zur Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung einer solchen Waschlösung wurden die Kartuschen nach der Anreicherung der Estrogene jeweils mit einer der folgenden Lösungen gewaschen:

10 ml H₂O

9 ml H₂O + 1 ml MeOH (H₂O/MeOH (9:1))

8 ml H₂O + 2 ml MeOH (H₂O/MeOH (8:2))

7 ml H₂O + 3 ml MeOH (H₂O/MeOH (7:3))

6 ml H₂O + 4 ml MeOH (H₂O/MeOH (6:4))

5 ml H₂O + 5 ml MeOH (H₂O/MeOH (5:5))

Das Waschen mit reinem Wasser brachte keine Verbesserung, mit steigendem Methanolanteil konnte jedoch ein deutliches Auswaschen der Verunreinigungen beobachtet werden. Der Estriol-Peak zeichnete sich immer deutlicher aus dem Huminstoff-Peak ab.

Die ideale Zusammensetzung der Waschlösung wurde mit 6 ml H₂O und 4 ml MeOH (H₂O/MeOH (6:4)) ermittelt. Ein höherer Methanolanteil führte dann zu einer vorzeitigen Elution von Estriol.

Anreicherung über zwei Kartuschen

Die Anreicherung erfolgte über zwei Kartuschen, die direkt aufeinander gesteckt wurden. Der Sinn dieses „Sandwich“-Aufbaus lag darin, dass die obere Kartusche nur die Verunreinigungen zurückhalten sollte, während auf der unteren Kartusche die Estrogene angereichert werden sollten. Als obere Kartusche kamen die in Tab. 7.2. im experimentellen Teil angegebenen Festphasen zum Einsatz, die untere Kartusche war wieder eine selbst gefüllte LiChrolut RP18-Kartusche. Die Kartuschen wurden nach der Anreicherung jeweils separat eluiert und analysiert.

Bezüglich der erhofften Abtrennung der Verunreinigungen hatte dieser Sandwich-Aufbau keine Vorteile, die Verunreinigungen waren bei allen vorgeschalteten Sorbentien stets auch auf der zweiten Kartusche zu finden. Bei Verwendung der NH₂-, PSA- und Diolphase reicherten sich die Begleitstoffe sogar nur auf der RP18-Phase an.

Mit dem Sandwich-Aufbau konnte aber gezeigt werden, dass die Kapazität von 1 g RP18-Sorbens für die Anreicherung von E1, E2 und EE2 aus 1 l Abwasser ausreichend ist. Dies belegten die Versuche mit zwei in Folge geschalteten RP18-Festphasen. E1, E2 und EE2 fanden sich hier vollständig auf der ersten Kartusche mit 200 mg Sorbens wieder. Für Estriol kann eine solche Aussage bezüglich der Kapazität oder des Durchbruchvolumens nicht getroffen werden, da E3 im Chromatogramm aus dem Peak der Verunreinigungen nicht sicher zu identifizieren war. Da die Wiederfindung von Estriol aber bereits bei der Anreicherung aus Aqua bidest. deutlich niedriger als die der anderen Estrogene war, und E3 aufgrund der drei Hydroxygruppen als relativ polare Verbindung einzustufen ist, muss bei der Anreicherung an einer RP-Phase von einem Durchbruch ausgegangen werden.

Aufreinigung des Eluats

Eine weitere Variante der Abtrennung von Störkomponenten besteht in der Aufreinigung des Eluats in einem der eigentlichen Festphasenextraktion nachgelagerten Schritt. Für dieses „Clean-Up“ wurden Kieselgel und Florisil als Sorbentien eingesetzt (siehe Tab. 7.3 im experimentellen Teil). Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an eine von Stumpf und Ternes beschriebene Methode [STUMPF, 1996]. Das Eluat wurde am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene abgedampft, in 400 µl Aceton wiederaufgenommen und mit weiteren 4,6 ml eines Gemisches aus Hexan und Aceton (65:35 V/V) über die Clean-Up-Phase chromatographiert. Die Versuche zeigten, dass die Polarität des Estriols erneut ein Problem darstellte, da die Elimination der Huminstoffe wieder zugleich mit Verlusten an Estriol verbunden war. Die Wiederfindungen nach Anreicherung von 1 l Abwasser lagen nach Aufreinigung über Florisil bei ca. 35% für E3 und ca. 85% für E1, E2 und EE2. Mit Kieselgel wurden ähnliche Wiederfindungen erhalten, die Abtrennung der Huminstoffe war jedoch weniger effektiv, so dass eine Bestimmung von E3 mittels HPLC kaum möglich gewesen wäre.

Ausgehend von Florisil wurde versucht, die Wiederfindung des Estriols zu verbessern. Hierzu wurde die prozentuale Zusammensetzung des Elutionsgemisches Hexan/Aceton variiert. Standardlösungen (1 µg/0,4 ml) wurden direkt auf die mit Florisil gefüllten Kartuschen aufgegeben und mit dem jeweiligen Lösemittelgemisch eluiert. Es zeigte sich, dass die Wiederfindung des Estriols mit steigendem Hexan-Anteil deutlich abnahm. Bei 65% Hexan lag sie nur noch bei ca. 40%, wohingegen die anderen Estrogene noch bis zu einem Hexangehalt von 85% mit über 90% Wiederfindung eluiert wurden. Da ein relativ hoher Hexan-Anteil aber entscheidend für die Abtrennung der Huminstoffe ist, musste mit einem Elutionsgemisch aus 65% Hexan und 35% Aceton ein Kompromiss auf Kosten der Estriol-Bestimmung eingegangen werden.

Es wurden alternativ Elutionsgemische aus Toluol und Ethylacetat getestet, mit denen allerdings keine besseren Ergebnisse erzielt werden konnten.

3.5.2.5 Trocknung der Kartuschen

Nach Elution des Sorbens muss zur anschließenden HPLC-Bestimmung das Lösemittel gewechselt werden. Reines Aceton bzw. eine Mischung aus Hexan und Aceton haben an einer RP-Phase eine sehr große Elutionskraft. Bei Aufgabe der Probe in einem solchen Lösemittel ist eine reproduzierbare Chromatographie nicht möglich. Das Eluat wird daher einrotiert und der trockene Rückstand in HPLC-Fließmittel wieder aufgenommen. Auch für die GC-Analytik ist es wichtig, dass Eluat zunächst einzudampfen. Dies bedeutet zum

einen eine Aufkonzentrierung der Probe und ermöglicht zum anderen eine Derivatisierung der Probe unter Ausschluss von Wasser.

Um das Eluat zur Trockene abrotieren zu können, muss es wasserfrei sein. Dies wird gewährleistet durch ein Trocknen des Sorbens vor der Elution. Es wurden verschiedene Techniken, wie z.B. das Durchsaugen von Luft bzw. Argon und das Trocknen im Vakuum-Trockenschrank erprobt. Als sehr einfach in der Durchführung und zuverlässiger als die anderen Methoden erwies sich aber die Gefriertrocknung. Die SPE-Kartuschen wurden über Nacht in die Gefriertrocknung gelegt und konnten am folgenden Tag eluiert werden (Gefriertrocknung siehe 7.1.2.3). Da die Proben so weder dem Einfluss erhöhter Temperatur noch dem Einfluss von Sauerstoff ausgesetzt sind, stellt die Gefriertrocknung die schonendste Methode dar. Sie wurde im Folgenden standardmäßig zur Trocknung der SPE-Kartuschen eingesetzt.

3.5.3 ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNG

Die zusätzlich eingeführten Reinigungsschritte führten zu einer deutlich verbesserten Abtrennung der Huminstoffe, und damit zu einer selektiveren Anreicherung der Estrogene. Es muss allerdings angemerkt werden, dass die Aufreinigung über Florisil gerade für Estriol auch mit deutlichen Empfindlichkeitseinbußen verknüpft war. Da aber alle vier Estrogene mit einer Methode bestimmt werden sollten, wurden diese Verluste hier bewusst in Kauf genommen. Eine Alternative hätte darin bestanden, für E3 eine eigene Methode zu entwickeln.

Die Abbildung 3.22 auf der nächsten Seite zeigt in einem Fließschema das Vorgehen bei der Festphasenextraktion der Estrogene.

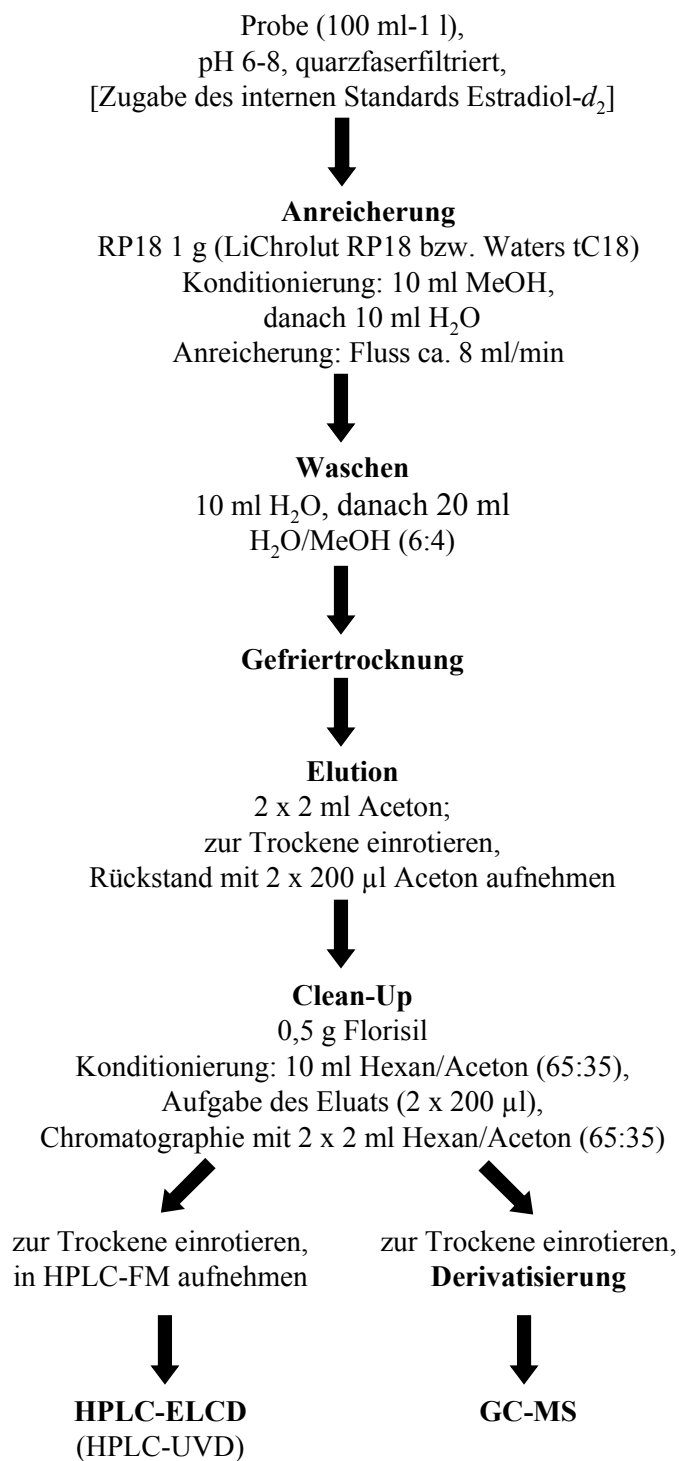


Abbildung 3.22: Fließschema zur SPE-Bestimmung der Estrogene

3.5.4 QUANTITATIVE BESTIMMUNG NACH SPE

Aufgrund der Vielzahl der im Verlauf einer Probenvorbereitung durchzuführenden Arbeitsschritte ist es sinnvoll, der Probe bereits zu Beginn der Aufarbeitung einen internen Standard zuzusetzen (Surrogat-Standard). Da sich der interne Standard im Idealfall wie der Analyt verhalten sollte, bieten sich besonders isotoopenmarkierte, z.B. deuterierte Analoga an. Das Einsatzgebiet ist dann allerdings auf die MS-Detektion beschränkt, da nur mittels Massenspektrometrie eine Unterscheidung zwischen markierter und nicht markierter Substanz möglich ist. Zur Quantifizierung mehrerer Analyte sollte im Idealfall für jeden Analyt ein entsprechender interner Standard zugesetzt werden. Unter der Bedingung, dass sich Analyt und interner Standard gleich verhalten, könnte die Kalibrierung dann direkt aus Standardlösungen erfolgen. Problematisch sind allerdings die hohen Kosten und die Verfügbarkeit der isotoopenmarkierten Standards, so dass einer Probe, auch wenn mehrere Verbindungen analysiert werden sollen, in der Regel nur ein interner Standard zugesetzt wird. Die Kalibrierung muss dann allerdings über das Gesamtverfahren erfolgen.

Da für die HPLC/ELCD der Einsatz eines deuterierten Standards nicht möglich ist, wurde bei dieser Methode gänzlich auf den Zusatz eines internen Standards verzichtet. Die Messergebnisse weisen so allerdings eine größere Streuung auf, da Unterschiede in der Probenaufarbeitung nicht korrigiert werden können.

Für die GC/MS wurde Estradiol- d_2 den Proben als Surrogat-Standard zugesetzt. Das deuterierte Estradiol ist ein idealer interner Standard für die Bestimmung des Estradiols, für die anderen Estrogene muss jedoch mit leichten Abweichungen im Anreicherungs- und chromatographischen Verhalten gerechnet werden.

3.5.4.1 Kalibrierung der Estrogene mittels SPE-HPLC/ELCD

Um abschätzen zu können, in welchem Konzentrationsbereich eine Kalibrierung mittels HPLC/ELCD möglich wäre, wurde die Konzentration der Probenlösungen zunächst auf 100 ng/l gesenkt. Trotz der zusätzlich eingeführten Aufreinigungsschritte zeigten sich noch recht große Störpeaks im Chromatogramm, die gerade die Bestimmung niedriger Konzentrationen empfindlich stören. Die Störpeaks wurden zu unterschiedlichen Retentionszeiten beobachtet, so dass angenommen werden musste, dass es sich um Verunreinigungen aus vorhergehenden Analysenläufen handelte, die noch auf der Säule verblieben waren und nun langsam eluiert wurden. Um diese Verunreinigungen vor einem neuen Analysenlauf zu entfernen, wäre es sinnvoll, mit einem Fließmittel-Gradienten zu arbeiten. Da die elektrochemische Detektion aber praktisch nicht für Gradientenläufe, sondern

nur für isokratische HPLC-Läufe einsetzbar ist, wurde zum Spülen der Säule eine Art „Säulenschaltung“ verwendet. Ein Schaltbild dieser Säulenschaltung ist in Abb. 7.1 im experimentellen Teil angegeben.

Für die chromatographische Bestimmung stehen beide Schaltventile in der LOAD-Position. Die Probe wird vom Autosampler injiziert, unter isokratischen Bedingungen in der Säule getrennt und elektrochemisch detektiert. Nach Beendigung des Analysenlaufs werden beide Ventile in die INJECT-Position umgeschaltet. In dieser Stellung durchströmt weiterhin Fließmittel die Detektorzelle, um den Grundstrom auf konstant niedrigem Niveau zu halten. Zur gleichen Zeit wird die HPLC-Säule mittels einer zweiten, gradientenfähigen Pumpe gespült und im Anschluss daran für die nächste Bestimmung wieder konditioniert. Nach dem Zurückschalten der Ventile in die LOAD-Position kann die neue Probe analysiert werden. Das zugehörige HPLC-Programm ist ebenfalls im experimentellen Teil (Tab. 7.7) angegeben.

Die folgenden Chromatogramme (Abb. 3.23a und b) zeigen in Gegenüberstellung einen Abwasserblindwert und eine mit 100 ng/l dotierte Abwasserprobe. Beide Proben wurden entsprechend des Fließschemas in Abb. 3.22 aufgearbeitet und unter Verwendung der Säulenschaltung mittels HPLC/ELCD analysiert.

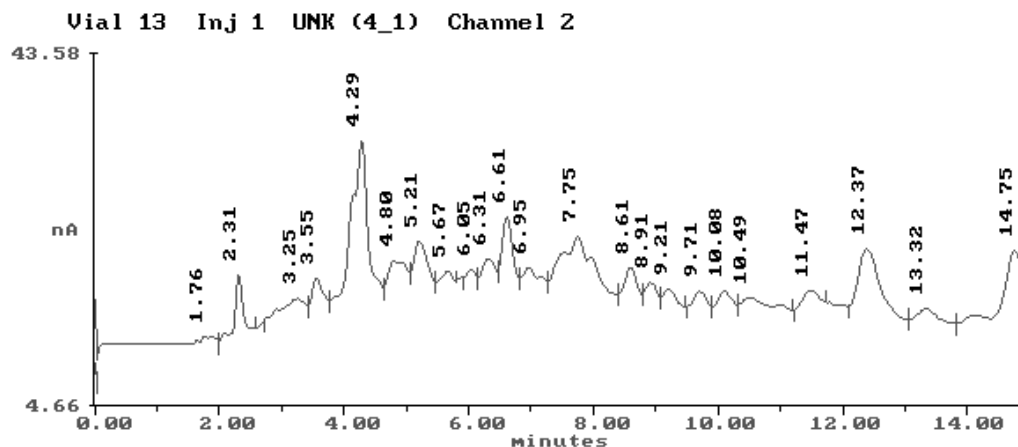


Abbildung 3.23a: SPE von 1 l Abwasser; HPLC/ESA (450 mV); LiChrospher 100 RP-18, 25 cm

Aus dem obigen Chromatogramm ist zu ersehen, dass der Blindwert trotz der Aufreinigungsschritte noch eine Vielzahl an Matrixpeaks aufweist, bei denen es sich außer den diskutierten Huminstoffen sicherlich auch um andere phenolische Verbindungen wie Flavonoide oder Industriephenole handelt. Eventuell sind E2, EE2 und E1 auch bereits im Abwasserblindwert enthalten.

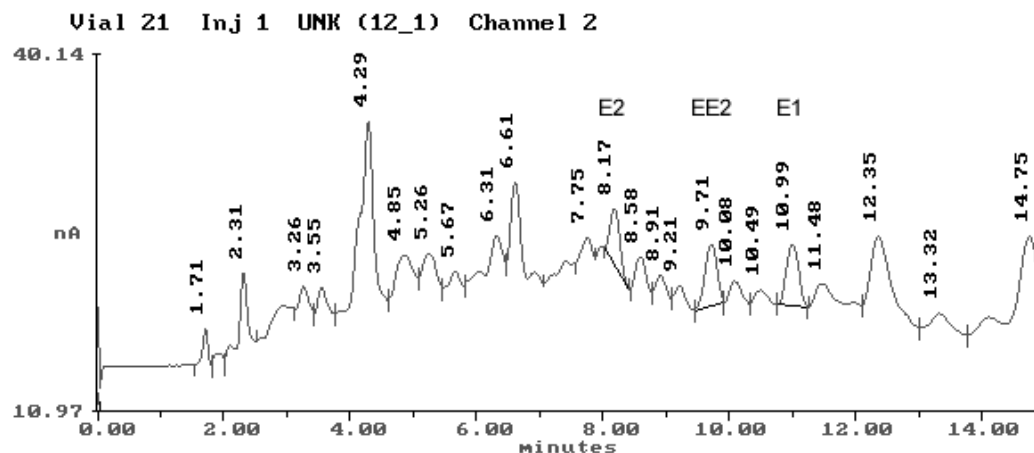


Abbildung 3.23b: SPE von 1 l Abwasser dotiert mit 100 ng/l E1, E2, EE2 und E3; HPLC/ESA (450 mV); LiChrospher 100 RP-18, 25 cm

Das Chromatogramm der dotierten Abwasserprobe (Abb. 3.23b) lässt deutlich erkennen, dass die Trennleistung der HPLC – trotz der hier verwendeten 25 cm-Säule – nicht ausreicht, um eine Abtrennung der Estrogene von den anderen Probenbestandteilen zu gewährleisten. Die Peaks der Estrogene erscheinen praktisch als Aufsetzer im Chromatogramm, sie coeluieren mit unbekannten Probenbestandteilen.

Die Selektivität der HPLC-Trennung mit elektrochemischer Detektion erlaubt keine sichere Abgrenzung und Identifizierung der Estrogene, so dass diese Methode für die Spurenanalytik nur bedingt einsetzbar ist. Eine quantitative Bestimmung ist praktisch nur in einem Konzentrationsbereich oberhalb der hier angereicherten 100 ng/l möglich, was allerdings über den tatsächlich im Abwasser zu erwartenden Konzentrationen liegt.

3.5.4.2 Kalibrierung der Estrogene mittels SPE-GC/MS

Die Vorteile der GC/MS gegenüber der HPLC/ELCD liegen sowohl in der höheren Trennleistung der Gaschromatographie, als auch in der besseren Selektivität der massenspektrometrischen Detektion. Wie bereits in Kapitel 3.4.3 gezeigt, kann mit Hilfe der MS anhand der Auswertung charakteristischer Ionen bzw. auch direkt durch Einsatz der SIM-Technik eine recht sichere Identifizierung einer Substanz auch aus stark matrixbelasteten Proben erfolgen.

Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Kalibrierung über das Gesamtverfahren in einem Konzentrationsbereich von 1-12,5 ng/l durchgeführt. Die Proben wurden in Aqua Bidest. entsprechend der Arbeitsvorschrift in 7.2 hergestellt. Die Konzentration des internen Standards Estradiol- d_2 betrug jeweils 10 ng/l. Nach vollständiger Aufarbeitung durch

SPE entsprechend des Analysenschemas in Abb. 3.22 erfolgte die Derivatisierung mit MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4). Um eine möglichst niedrige Bestimmungsgrenze zu erreichen wurden 2 µl der derivatisierten Analysenlösung injiziert. Die GC/MS-Bestimmung wurde im SIM-Modus durchgeführt. Die Geräteparameter und Messbedingungen sind im experimentellen Teil angegeben (7.1.2.6). Die Messwerte finden sich im Anhang (8.1.6). Die folgende Graphik zeigt die erhaltenen Kalibrierkurven.

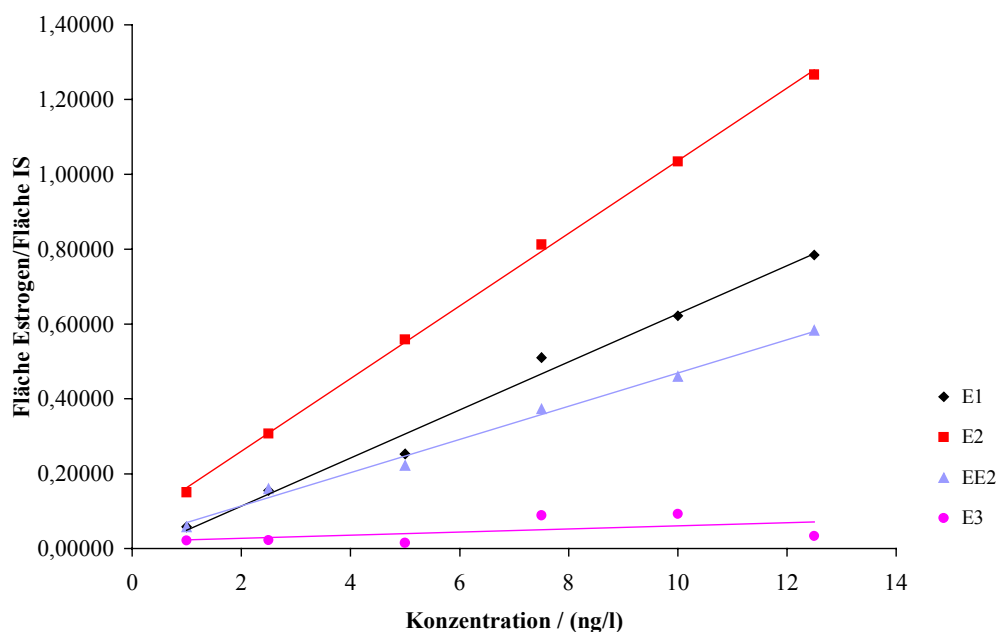


Abbildung 3.24a: Kalibrierkurven für E1, E2, EE2 und E3: 1-12,5 ng/l (d_2 -E2: 10 ng/l)

Anreicherung über SPE (Waters tC18, 1g), GC/MS (SIM), Derivatisierung mit MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4), manuelle Injektion von 2 µl, n=1

LINEARER AUSGLEICH	$E1/d_2-E2$	$E2/d_2-E2$	$EE2/d_2-E2$	$E3/d_2-E2$
Ordinatenabschnitt b:	-0,0153	0,0651	0,0241	0,0193
Steigung m:	0,0642	0,0971	0,0445	0,0041
Reststandardabweichung s_y :	0,0349	0,0137	0,0200	0,0337
Verfahrensstandardabw. s_{x0} :	0,5436	0,1411	0,4494	8,2195
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9881	0,9992	0,9918	0,2652
Anzahl der Messwerte n:	6	6	6	6

Abgesehen von Estriol weisen die Kalibrierkurven der Estrogene eine gute Korrelation über den vermessenen Konzentrationsbereich auf. Dass dies beim Estriol nicht der Fall ist, ist wahrscheinlich auf die im Rahmen der SPE durchgeführten Aufreinigungsschritte zurückzuführen. Verluste durch die Probenvorbereitung machen sich bei den hier angereicherten niedrigen Konzentrationen bereits recht signifikant bemerkbar und führen zu

schlecht reproduzierbaren Ergebnissen. Um die Linearität und Empfindlichkeit der E3-Bestimmung zu verbessern, wurde auf den Waschschrift mit H₂O/MeOH (6:4) verzichtet, und die Kalibrierung unter ansonsten gleichen Bedingungen noch einmal wiederholt.

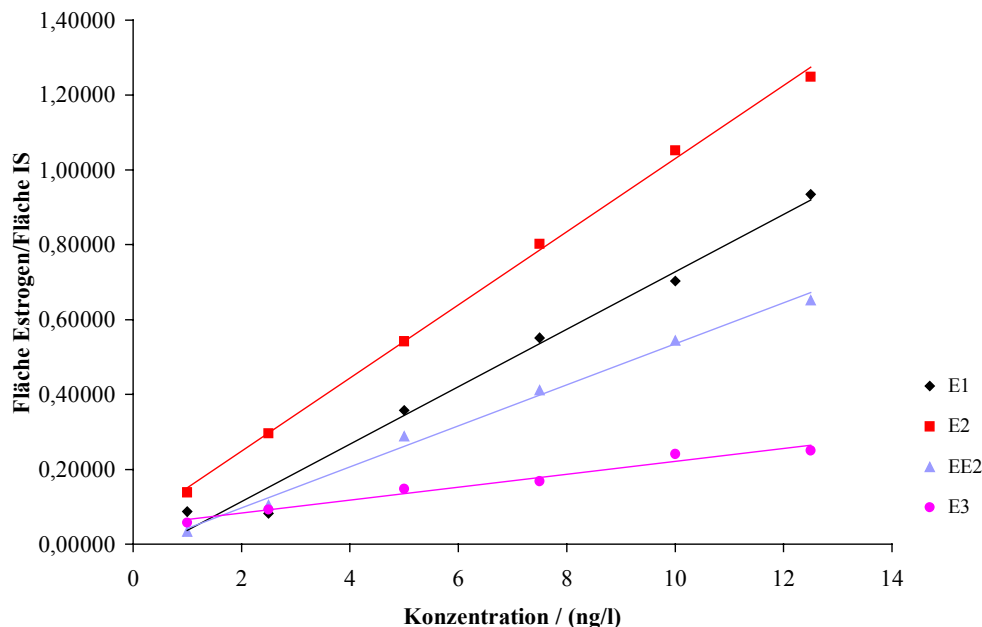


Abbildung 3.24b: Kalibrierkurven für E1, E2, EE2 und E3: 1-12,5 ng/l (d_2 -E2: 10 ng/l)
Durchführung wie 3.24a, nur ohne den Waschschrift mit H₂O/MeOH (6:4)

LINEARER AUSGLEICH	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2	E3/ d_2 -E2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0404	0,0520	-0,0132	0,0483
Steigung m:	0,0768	0,0979	0,0549	0,0173
Reststandardabweichung s_y :	0,0462	0,0197	0,0213	0,0153
Verfahrensstandardabw. s_{x0} :	0,6016	0,2012	0,388	0,8844
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0,9854	0,9983	0,9939	0,9689
Anzahl der Messwerte n:	6	6	6	6

Die Graphik lässt nun auch für Estriol den gewünschten linearen Zusammenhang erkennen, allerdings ist die Empfindlichkeit der Estriol-Bestimmung immer noch deutlich schlechter als die der anderen Estrogene. Als weitere Maßnahme könnte der Clean-Up-Schritt über Florisil komplett weggelassen werden. Da dies allerdings eine starke Matrixbelastung der angereicherten Probe zur Folge hätte, und damit auch eine starke Verschmutzung des GC/MS bewirken würde, wurde diese Möglichkeit nicht weiter in Betracht gezogen.

Als Bestimmungsgrenzen ($S/N=10:1$) für die Anreicherung über SPE wurden für E2 0,5 ng/l, für E1 und EE2 1 ng/l und für E3 2 ng/l ermittelt (ohne den Waschschrift mit

H₂O/MeOH (6:4)). Zur Bestimmung der Präzision wurde eine Probenlösung der Konzentration 10 ng/l (*d*₂-E2: 10 ng/l) jeweils dreimal unter den gleichen Bedingungen, ebenfalls ohne den Waschschriff mit H₂O/MeOH (6:4), extrahiert. Als Variationskoeffizienten wurden für E1 5,7%, für E2 2,4%, für EE2 14,4% und für E3 20,4% erhalten. Die zugehörige Tabelle mit den Messwerten ist im Anhang angegeben (8.1.6).

3.6 FESTPHASENMIKROEXTRAKTION (SOLID PHASE MICRO EXTRACTION, SPME)

3.6.1 OPTIMIERUNG DER PARAMETER

Der erste Schritt zur Entwicklung einer SPME-Methode besteht darin, den Einfluss der Versuchsbedingungen auf das Ausmaß der Anreicherung zu überprüfen und zu optimieren. Das vorrangige Ziel der Optimierung für die Spurenanalytik ist wieder die Anreicherung maximaler Stoffmengen, um möglichst niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erzielen.

ANREICHERUNG DER ANALYTE

Die zu optimierenden Parameter ergeben sich aus der Gleichung für die angereicherte Stoffmenge im Verteilungsgleichgewicht (siehe auch Gleichung (5)):

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s c_o}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (9)$$

n_f ist demnach abhängig von der Größe der Verteilungskoeffizienten der Analyte zwischen Faser und Lösung (K_{fs}), dem Faservolumen (V_f) und dem Analysenvolumen (V_s).

Als zusätzlicher Optimierungsparameter ist noch die Anreicherungszeit (t_{ex}) zu berücksichtigen, da aus praktischen Gründen oftmals nicht bis zur Einstellung des Gleichgewichtes gewartet werden kann.

Im Folgenden wird beschrieben, wie durch entsprechende Wahl der Versuchsbedingungen auf diese Parameter Einfluss genommen werden kann.

Verteilungskoeffizient Faser/Lösung (K_{fs}):

Der Verteilungskoeffizient beschreibt die Lage des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen Faser und Lösung. Je größer K_{fs} ist, desto mehr Substanz wird an der Faser angereichert. Die Größe des Verteilungskoeffizienten hängt von den folgenden Versuchsbedingungen ab:

- Ar der Faserbeschichtung

Für das entsprechende Analysenproblem sollte eine für die Analyten möglichst selektive Phase ausgewählt werden, die diese auch möglichst effektiv anzureichern vermag (großer K_{fs} -Wert).

- Anreicherungstemperatur

Eine Temperaturerhöhung hat zunächst einen Einfluss auf die Diffusionskoeffizienten der Analyte in Faser und Lösung. Das Ausmaß der Anreicherung wird dadurch zwar nicht beeinflusst, die Anreicherung erfolgt jedoch in kürzerer Zeit.

Die Anreicherungstemperatur wirkt sich aber auch auf die Verteilungskoeffizienten der Analyte aus. Analog der Löslichkeit von Flüssigkeiten oder Feststoffen sollte auch die Verteilung der Analyte zwischen Faser und Lösung temperaturabhängig sein. Arthur et al. schreiben in einer Veröffentlichung zur Optimierung der SPME, dass die Anreicherung der Analyte an der Faser thermodynamisch gesehen einen exothermen Prozess darstelle. Eine Temperaturerhöhung führe demnach zu einer Erniedrigung der Verteilungskoeffizienten, und damit zu einer Verringerung der angereicherten Stoffmenge [ARTHUR, 1992].

- pH-Wert

Zur Wahl des pH-Wertes gilt das bereits bei der LLE und SPE angeführte. Um einen möglichst großen K_{fs} -Wert zu realisieren, müssen die Analyte in ungeladener Form in der Lösung vorliegen.

- Ionenstärke

Ebenso wie bei der LLE und SPE kann man sich auch hier wieder durch Zugabe von Salzen zur Probenlösung den „Aussalzeffekt“ zunutze machen.

- Matrixbestandteile

In realen Proben liegen neben den Analyten zumeist noch vielfältige andere, oftmals auch unbekannte Substanzen vor. Bei diesen Matrixbestandteilen kann es sich z.B. um organische Lösemittel oder Tenside handeln, die die Löslichkeit der Analyte in der wässrigen Phase erhöhen. Dies hätte eine Verringerung der K_{fs} -Werte zur Folge. Aber auch makromolekulare Bestandteile wie Huminstoffe in Umweltproben oder Proteine in biologischen Proben können, z.B. durch Adsorption der Analyte, deren K_{fs} -Wert erniedrigen.

Faservolumen (V_f):

Die Anreicherung der Analyten an der Faser ist umso effektiver, je größer das Faservolumen gewählt wird. Um dieses zu vergrößern, kann entweder die Dicke der Faserbeschichtung oder die Oberfläche des Polymerfilmes erhöht werden.

- Dicke der Faserbeschichtung

Für die PDMS-Phase sind verschiedene Faserdicken beschrieben und auch kommerziell erhältlich (7 μm , 30 μm und 100 μm). Ein Problem beim Einsatz einer dickeren Phase besteht allerdings darin, dass sich aufgrund der längeren Diffusionswege der Analyte auch die Analysenzeiten erhöhen. Sinnvoll ist der Einsatz dieser Fasern daher nur für relativ flüchtige Verbindungen bzw. bei niedrigen K_{fs} -Werten der Analyte.

- Oberfläche der Faser

Empfindlichere Anreicherungen, die nicht mit einer Verlängerung der Analysendauer einher gehen, erzielt man durch Vergrößerung der Faseroberfläche unter Beibehaltung der Filmdicke. Hierzu wird entweder die Faser verlängert oder der Durchmesser des Faserkerns erhöht. Problematisch ist jedoch die Praktikabilität dieser Veränderungen. Eine längere Faser kann z.B. schlecht für kleine Analysenvolumina eingesetzt werden und ist zudem empfindlicher gegenüber mechanischer Beanspruchung. Ebenso kann eine Faser mit größerem Durchmesser u.U. nicht in einem handelsüblichen GC-Injektor desorbiert werden.

Neuere Ansätze gehen daher in die Richtung, dass die Polymerbeschichtung statt auf die äußere Oberfläche einer Quarzfaser, auf die innere Oberfläche einer Kanüle aufgebracht wird. Diese Methode wird als „in-tube SPME“ bezeichnet. Aufgrund des größeren Innendurchmessers dieser Kanülen erhält man so auch größere Oberflächen. Ein weiterer Vorteil besteht in der höheren Stabilität gegenüber den herkömmlichen SPME-Fasern, die wegen ihres Quarzfaserkerns sehr leicht brechen. Die SPME-Mischphasen sind zwar mittlerweile auch in Form sogenannter StableFlex™ Fasern erhältlich, bei denen der Quarzfaserkern durch einen Polymerüberzug biegsam gemacht wurde, so dass die Fasern praktisch nicht mehr brechen können. Für die Verteilungsphasen (PDMS und Polyacrylat) gibt es diese flexiblen Fasern jedoch nicht, wahrscheinlich weil durch die Polymerbeschichtung Wechselwirkungen mit den Analyten auftreten könnten.

Eine sehr effektive Oberflächenvergrößerung wurde durch die Firma Gerstel (Mülheim) realisiert. Der sogenannte Gerstel-Twister™ stellt ein Rührstäbchen dar, welches mit einem Polymerfilm beschichtet ist und zur Anreicherung direkt in die Analysenlösung eingebracht wird [GERSTEL, 2000]. Diese Methode, die auch als Stir

Bar Sorptive Extraction (SBSE) bezeichnet wird, ermöglicht gegenüber der konventionellen SPME Bestimmungen, die um den Faktor 1.000 empfindlicher sind. Von Nachteil ist jedoch, dass die Desorption nicht in einem handelsüblichen GC-Injektor, sondern nur in einem speziellen Thermodesorptionssystem der Firma Gerstel erfolgen kann.

Analysenvolumen (V_s):

Die an der Faser angereicherte Stoffmenge hängt auch vom vorgelegten Probenvolumen ab. Für den Fall das $V_s \gg K_{fs} V_f$ ist, wird n_f maximal und vom Analysenvolumen unabhängig (siehe Gleichung (9)). Dies kann je nach Größe des K_{fs} -Wertes z.B. schon bei 5 ml oder aber auch erst bei wesentlich größeren Volumina der Fall sein. Für Anreicherungen im Labormaßstab wird man jedoch aufgrund apparativer Gegebenheiten oftmals relativ kleine Volumina einsetzen, und sich daher meist nicht im Bereich der Volumenunabhängigkeit befinden.

Anreicherungszeit (t_{ex}):

Die effektivste Anreicherung ist dann erreicht, wenn die Anreicherungszeit so gewählt wurde, dass sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Faser und Lösung einstellen konnte. Diese Zeit kann in Abhängigkeit der folgenden Parameter von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden betragen.

- **Durchmischung der Lösung**

Bei einer rein statischen Anreicherung würde sich aufgrund der geringen Diffusion der Analyte im Wasser schnell eine Verarmungsschicht um die Faseroberfläche ausbilden. Die Dicke dieser Schicht ist dann maßgeblich für die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung verantwortlich. Um diese Zeit möglichst gering zu halten, ist eine Durchmischung der Lösung unumgänglich. Der Idealfall wäre demnach eine perfekt durchmischte Lösung. Die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichtes ist dann allein von der Diffusion der Substanzen in die Faserbeschichtung abhängig. Dieser Idealfall ist allerdings in der Praxis nicht zu erreichen, da die Oberfläche der Faser immer mit einem dünnen stationären Flüssigkeitsfilm bedeckt sein wird. Allerdings gilt, dass je besser die Durchmischung, desto dünner auch dieser stationäre Film ist. Zur Durchmischung der Lösung werden meist die folgenden Techniken genutzt: Rühren mittels Magnetrührer, Vibration der Faser, Ultraschall oder der Einsatz von Durchflußzellen.

- K_{fs} -Wert der Analyte

Die Substanzeigenschaften und damit die Verteilungskoeffizienten der Substanzen haben einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Anreicherungszeit. Analyten mit größeren K_{fs} -Werten werden stärker angereichert, benötigen jedoch auch meist länger bis zur Einstellung des Gleichgewichtes [PAWLISZYN, 1997].

- Anreicherungstemperatur

Eine Erhöhung der Temperatur führt, wie bereits oben angeführt, zu einer Erhöhung der Diffusionskoeffizienten der Substanzen in Faser und Lösung, was wiederum eine schnellere Gleichgewichtseinstellung zur Folge hat.

- Art und Dicke der Faserbeschichtung

Die Anreicherungszeit hängt auch von der Art des Polymeres ab, da Substanzen für verschiedene Polymere unterschiedliche Diffusionskoeffizienten aufweisen. Die Diffusionskoeffizienten organischer Moleküle sind z.B. in Polyacrylat kleiner als in PDMS [GORECKI, 1999]. Die Quervernetzung eines Polymeres ebenso wie die Dicke des Polymerfilmes haben ebenfalls einen Einfluss auf die Anreicherungszeit.

DESORPTION DER ANALYTE

Neben der Optimierung der Anreicherungsbedingungen müssen bei der SPME auch die Desorptionsbedingungen überprüft und optimiert werden. Die Desorption sollte vollständig erfolgen, und eine Probenverschleppung in den nächsten Analysenlauf sollte ausgeschlossen werden. Weiterhin wäre es im Hinblick auf den Einsatz der Methode zur Spurenanalytik wünschenswert, dass basisliniengetrennte, möglichst scharf ausgebildete Peaks nach der chromatographischen Trennung erhalten werden.

Da es sich bei der Desorption praktisch um den umgekehrten Vorgang der Anreicherung handelt, spielen hierbei auch analoge Parameter eine Rolle. Dies wären die Verteilungskoeffizienten der Analyte zwischen Faser und Gasphase (K_{fh}) sowie das Volumen der Gasphase (V_h) und die Desorptionszeit (t_{de}). (Das Faservolumen ist jetzt natürlich keine veränderliche Größe mehr.)

Durch entsprechende Wahl der Desorptionsbedingungen können die genannten Parameter wie folgt beeinflusst werden.

Verteilungskoeffizient Faser/Gasphase (K_{fh})

Im Falle der Desorption ist es nicht nur wünschenswert, dass sich ein Verteilungsgleichgewicht der Analyte zwischen Faser und Gasphase einstellt, sondern die Lage des Gleichgewichtes sollte auch praktisch vollständig zur Gasphase hin verschoben sein. Die

Grundvoraussetzung dafür ist der Übertritt der Analyte in die Gasphase, der entscheidende Parameter also zunächst die Desorptionstemperatur.

- Desorptionstemperatur

Zur thermischen Desorption der Analyte müssen diese flüchtig sein, bzw. in den gasförmigen Zustand überführt werden können, d.h. die Injektortemperatur muss entsprechend der Eigenschaften der Analyte gewählt werden.

Bei relativ schwer flüchtigen Verbindungen stößt man hier jedoch schnell an die Grenzen des Möglichen, denn ebenso wie GC-Säulen ein Temperaturlimit aufweisen, können auch SPME-Fasern nur bis zu einer bestimmten Maximaltemperatur erhitzt werden (siehe Tab. 7.4 im experimentellen Teil). Als mögliche Abhilfe wäre eine Derivatisierung der Analyte denkbar, die zum einen die Siedepunkte der Verbindungen senken, zum anderen aber auch deren thermische Stabilität erhöhen könnte.

Eine Temperaturerhöhung führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Diffusionskoeffizienten, und damit zu einer schnelleren Desorption.

- Gasphase

Das Trägergas dient dem Abtransport der Analyte von der Faseroberfläche auf die GC-Säule. Die Art des Trägergases hat praktisch keinen Einfluss auf die Desorption.

Volumen der Gasphase (V_h)

Das Volumen der Gasphase ist für die Desorption im Injektor eines Gaschromatographen kein begrenzender Faktor, da der Einlass so aufgebaut ist, dass ständig frisches Trägergas an der Faser vorbeiströmt. Dieser dynamische Desorptionsprozess ermöglicht eine erschöpfende Desorption der Analyte.

Desorptionszeit (t_{de})

Aufgrund der meist niedrigen Analysenkonzentration erfolgt die Desorption der Analyte in der Regel splitlos. Die effektive Desorptionszeit entspricht damit der Zeit, die der Splitausgang geschlossen ist und alle Substanz, die von der Faser desorbiert wird, direkt auf die GC-Säule überführt wird.

- Desorptionstemperatur

Je höher die Desorptionstemperatur gewählt wird, desto kleiner wird der K_{fh} -Wert der Substanzen und desto größer ihr Diffusionskoeffizient, d.h. um so schneller erfolgt die Desorption. Zu beachten ist hierbei, dass die Faser in die Mitte des Liners eingebracht wird, da dort die Temperatur am höchsten ist.

- Lineare Strömungsgeschwindigkeit

Eine möglichst kurze Desorptionszeit wird dadurch realisiert, dass das Trägergas mit einer hohen linearen Strömungsgeschwindigkeit den Liner durchströmt. Dies hat zur Folge, dass bereits desorbierte Analyte direkt von der Oberfläche der Faser abtransportiert werden, und damit nicht mehr mit dieser wechselwirken können. Die Konzentration an Analyten in der direkten Umgebung der Phase sollte im Idealfall gleich Null sein. In der Praxis geht man so vor, dass Liner mit möglichst kleinen Innendurchmessern verwendet werden. Da bei der SPME keine Lösemittel in den GC eingebracht werden, muss auch mit keiner Expansion der Lösemittel im Injektor gerechnet werden.

Da die Desorptionszeiten von wenigen Sekunden für leicht flüchtige bis hin zu mehreren Minuten für schwerer flüchtige Verbindungen betragen können, ist es oft nötig, die Substanzen am Säulenanfang noch einmal zu fokussieren. Dies kann so geschehen, dass die Säulenkopftemperatur deutlich unterhalb der Siedetemperatur der Analyte gewählt wird (Kryofokussierung). Eventuell reicht auch der Einsatz einer Säule mit dickerer Filmbelegung oder einer unbelegten Vorsäule (Retention Cap) aus.

Um eine Probenverschleppung auszuschließen, ist es sinnvoll, die Faser auch nach beendeter Desorption, also nach Öffnen des Splitventils, noch für eine gewisse Zeit im heißen Injektor zu belassen. Dies stellt sicher, dass eventuell auf der Phase verbliebene Analyte oder Matrixbestandteile noch thermisch entfernt werden können.

3.6.2 ÜBERPRÜFUNG DER PARAMETER MITTELS GC/FID

Ein Großteil der in 3.6.1 diskutierten Parameter sollte nun praktisch für die SPME-Analytik der Estrogene überprüft werden.

Hierzu wurde wie folgt vorgegangen:

- Die verschiedenen Versuchsbedingungen, die einen Einfluss auf die Anreicherung und Desorption der Analyte haben könnten, wurden ausgehend von Standardbedingungen variiert. Die Wahl der Standardbedingungen erfolgte aufgrund von Vorversuchen. Für die Messungen wurde jeweils die zu optimierende Größe verändert und zu jeder Änderung wurden drei Messwerte ermittelt.

SPME-Standardbedingungen:Anreicherung

Volumen:	3 ml
Anreicherungstemperatur:	40 °C
Anreicherungszeit:	15 min
Rührgeschwindigkeit:	1000 U/min
pH-Wert:	≤ 8
MeOH-Gehalt:	1% (V/V)
Salz:	keine Zugabe

Desorption

Desorptionstemperatur:	280 °C
Desorptionszeit:	5 min + weitere 5 min bei offenem Split
Liner:	4 mm einseitig zulaufend

- Die Messungen erfolgten manuell ohne Einsatz eines Autosamplers.
- Die Messungen zu einem Optimierungsparameter wurden immer an der gleichen Faser durchgeführt. Insgesamt wurden für alle Messungen jedoch mehrere Fasern verbraucht, da diese teilweise nur eine relativ kurze Lebensdauer aufwiesen.
- Die Konzentration der Estrogene in den Anreicherungslösungen betrug jeweils 0,5 mg/l (500 ppb), als Lösemittel wurde Aqua bidest. verwendet. Es wurde kein interner Standard zugesetzt (siehe Arbeitsvorschrift 7.2). Zur Methodenentwicklung wurde bewusst von recht hohen, für reale Proben unrealistischen Konzentrationen ausgegangen. Es sollte aber zunächst die Auswirkung der veränderten Versuchsbedingungen auf die SPME überprüft werden. Außerdem war es so möglich, den größten Teil der Messungen am GC/FID durchzuführen, der wesentlich einfacher und unkomplizierter in der Handhabung ist als die MS.
- Die Anreicherungslösung enthielt die Estrogene Estron, Estradiol und Ethinylestradiol. Estriol wurde in die Untersuchungen nicht mit einbezogen, da es underivatisiert nicht gaschromatographisch bestimmbar ist (siehe 3.3.1). Ethinylestradiol wurde trotz seiner thermischen Instabilität mit angereichert. Der Fehler durch die Bildung von Estron wurde unter den Analysenbedingungen als vernachlässigbar angesehen.
- Die ermittelten Peakflächen wurden nicht in absolute Konzentrationen umgerechnet, sondern direkt miteinander verglichen. In den Graphiken sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen eingezeichnet. Wertetabellen mit allen Messwerten sind im Anhang 8.1.7 angegeben.

Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau der SPME-Anreicherungen:

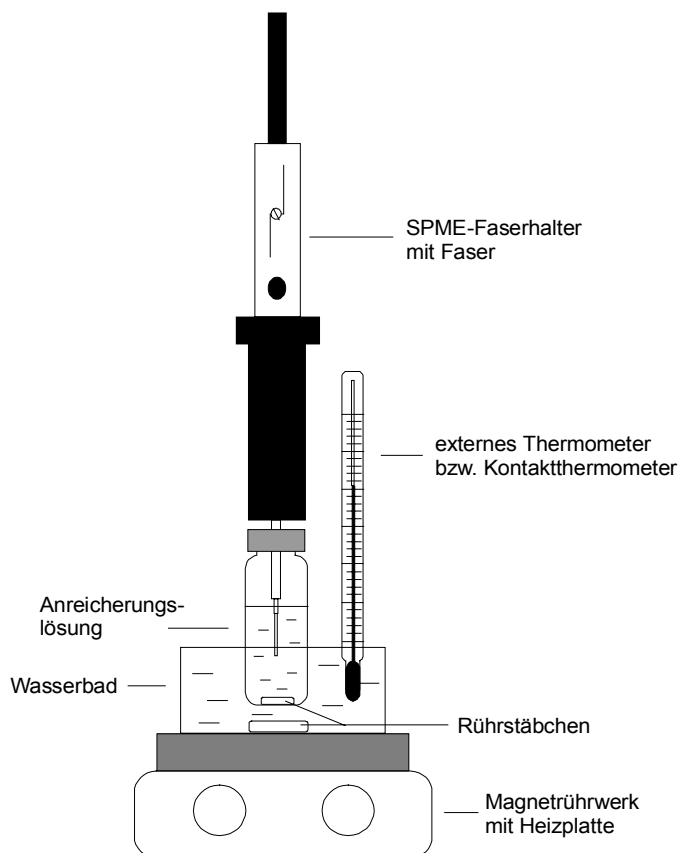


Abbildung 3.25: Versuchsaufbau zur SPME-Anreicherung

3.6.2.1 Art der Faserbeschichtung

Für die Untersuchungen standen die in der Tab. 7.4 (7.1.2.4) aufgeführten Fasern mit Ausnahme der 30 μm -PDMS-Faser zur Verfügung. Die Anreicherung an den verschiedenen Phasentypen ergab, dass nur bei Verwendung der 85 μm -Polyacrylat- und der 65 μm -Carbowax-DVB-Phase eindeutig zuzuordnende Peaks für alle drei Estrogene erhalten wurden. Dies verwunderte zunächst, da gerade diese beiden SPME-Phasen als „polar“ eingestuft werden, und die Estrogene aufgrund ihrer Struktur eher als unpolare Verbindungen angesehen wurden. Vergleicht man die Strukturen jedoch mit den üblicherweise an PDMS-Phasen angereicherten Substanzen wie VOCs, PAKs oder BTX-Aromaten, dann sind die Estrogene aufgrund ihrer phenolischen und alkoholischen Hydroxygruppen bereits als „polare“ Verbindungen einzuordnen.

Als ein entscheidendes Problem bei der Verwendung der Carbowax-DVB-Phase stellte sich heraus, dass diese mit einer Maximaltemperatur von 260 °C für die Estrogenanalytik

nicht ausreichend temperaturstabil ist. Ohne Derivatisierung sind 260 °C zur vollständigen Desorption der Estrogene nicht ausreichend, was sich auch in den Peakflächen widerspiegelte, die um den Faktor 4-5 kleiner als nach Anreicherung an Polyacrylat waren.

⇒ Die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich unter Verwendung der 85 µm-Polyacrylat-Faser (PA) durchgeführt.

3.6.2.2 Anreicherungstemperatur

Die Ergebnisse der Variation der Anreicherungstemperatur im Bereich von 30-80 °C sind der folgenden Abbildung zu entnehmen. Die Kurven lassen zunächst einen Anstieg, dann ein Art Plateau im Bereich von 40-60 °C und im weiteren Verlauf wieder einen Abfall der Peakflächen erkennen. Das Temperaturoptimum scheint im Bereich von 60 °C zu liegen. Diese Aussage lässt sich aber aufgrund der relativ großen Messwertschwankungen nur sehr vage treffen.

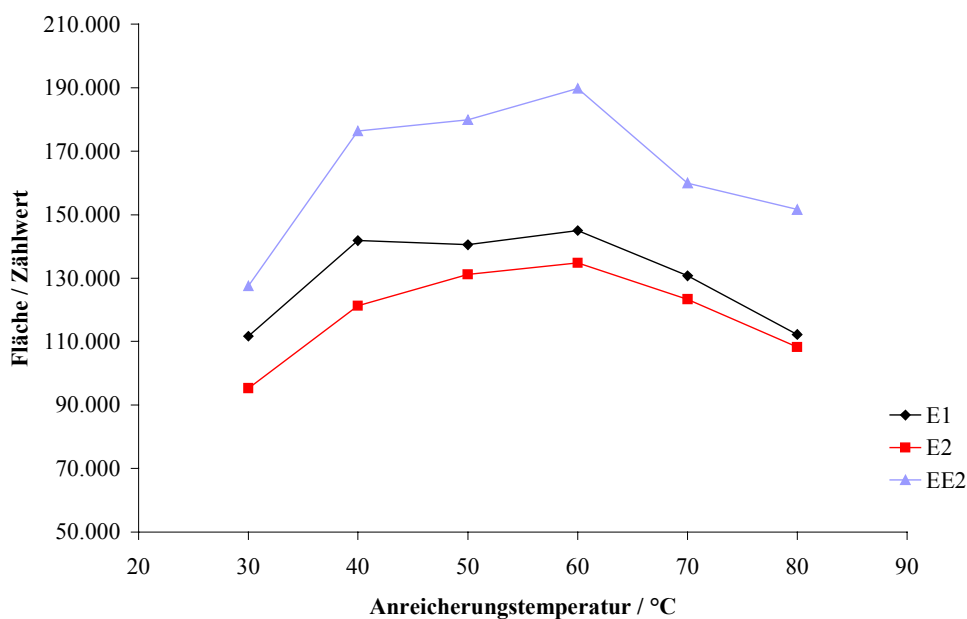


Abbildung 3.26: Abhängigkeit der Peakflächen von der Anreicherungstemperatur

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: Temperatur variabel, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Der Kurvenverlauf lässt sich eventuell so erklären, dass eine Temperaturerhöhung – wie bereits unter 3.6.1 besprochen – zum einen zu einer Erhöhung der Diffusionskoeffizienten führt, zum anderen aber auch eine Erniedrigung der Verteilungskoeffizienten bewirken kann. Bei Erhöhung der Anreicherungstemperatur kann so zunächst der Effekt der erhöhten Diffusion überwiegen, d.h. pro Zeit gelangen mehr Moleküle in die Faser, bei weiterer Temperaturerhöhung sinkt jedoch die Zahl der angereicherten Moleküle aufgrund kleiner werdender K_{fs} -Werte.

⇒ Um eine möglichst maximale Anreicherung zu erzielen, wurde für die quantitativen Bestimmungen die Anreicherungstemperatur auf 60 °C erhöht.

3.6.2.3 Anreicherungszeit

Die optimale Anreicherungszeit ist dann erreicht, wenn sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Faser und Lösung eingestellt hat. Eine längere Anreicherung bewirkt keine weitere Zunahme der angereicherten Stoffmenge.

Um diesen Zeitpunkt zu ermitteln wurden zunächst Einfachanreicherungen über verschiedene Zeiträume im Bereich von 5-240 min durchgeführt. Die erhaltenen Kurven sind in der nachfolgenden Graphik dargestellt. Die Änderung der Peakflächen scheint nach etwa 2 h nur noch relativ gering zu sein.

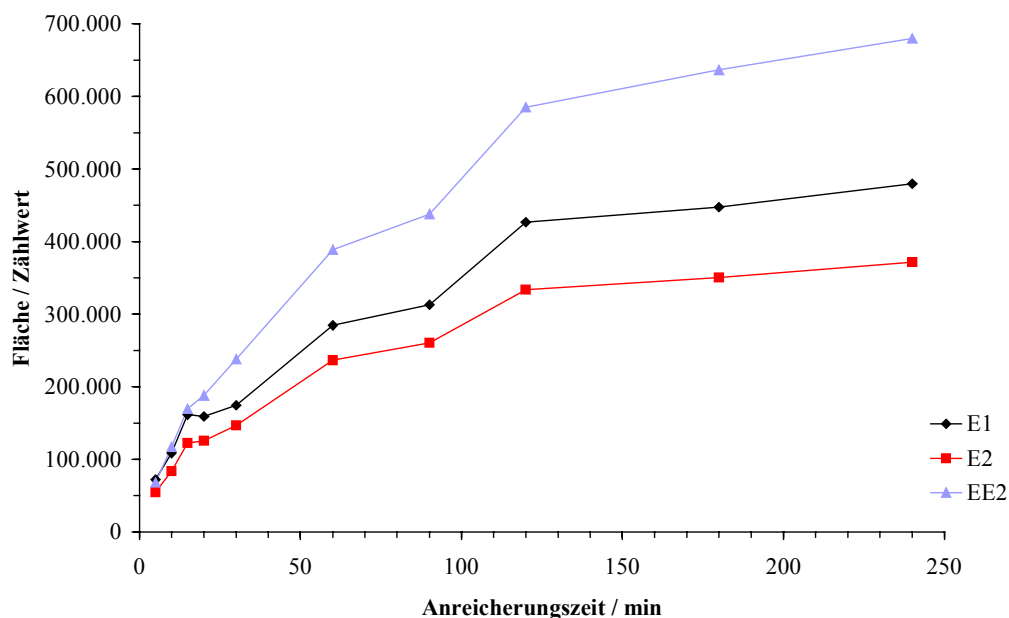


Abbildung 3.27: Abhängigkeit der Peakflächen von der Anreicherungszeit

1mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, Zeit variabel, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=1

Diese Vermutung sollte durch weitere Messungen, diesmal wieder als Dreifachbestimmung durchgeführt, abgesichert werden. Die Anreicherungszeiten wurden jetzt auf einen Bereich von 5-150 min eingegrenzt.

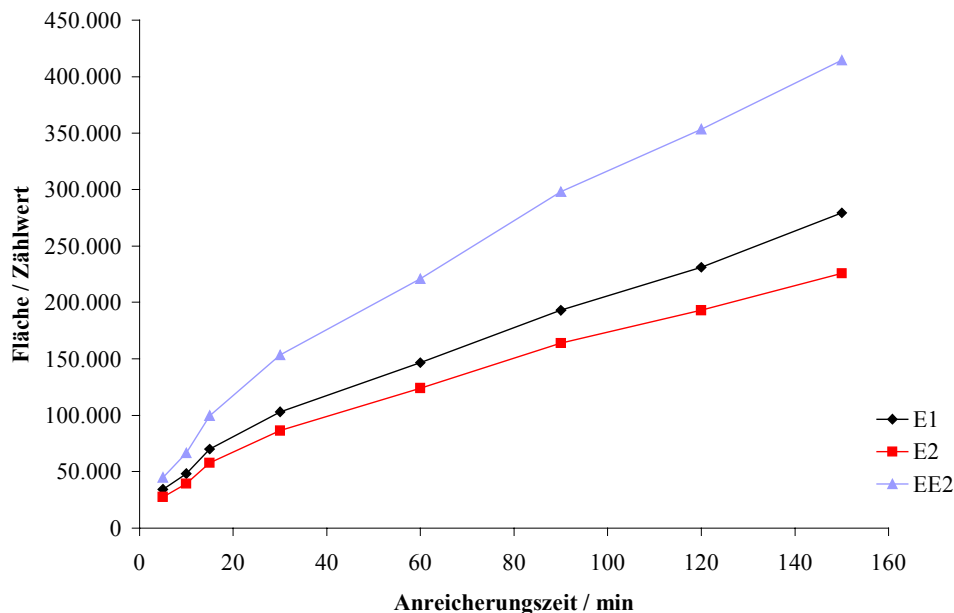


Abbildung 3.28: Abhängigkeit der Peakflächen von der Anreicherungszeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, Zeit variabel, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Die Ergebnisse bestätigten nicht die Vermutung. Wie aus der Darstellung zu ersehen, ist für die Peakflächen auch nach 2 h noch ein stetiger Anstieg zu erwarten, d.h. der Gleichgewichtszustand sicher noch nicht erreicht.

Anreicherungszeiten länger als 30 min sind jedoch für den Einsatz der SPME als Routine-methode problematisch. Im Idealfall sollte die Anreicherung in der Zeit abgeschlossen werden, die für einen GC-Lauf benötigt wird. Anreicherungen und Messungen können so direkt nacheinander erfolgen. Ein Abbrechen der Anreicherung vor Erreichen des Gleichgewichtes hat allerdings zur Folge, dass zum einen wertvolle Empfindlichkeit für die Spurenanalytik verloren geht und zum anderen Gleichung (5) bzw. (9), die den linearen Zusammenhang zwischen angereicherter Stoffmenge und Analysenkonzentration beschreibt, keine Gültigkeit hat. Ai konnte jedoch zeigen, dass zwischen angereicherter Stoffmenge n_f und Ausgangskonzentration des Analyten in der Lösung c_0 auch vor Erreichen des Gleichgewichtes ein direkt proportionaler Zusammenhang besteht, und zwar unter der Bedingung, dass auf die strikte Einhaltung der Versuchsbedingungen, insbesondere der Anreicherungszeit, geachtet wird [Ai, 1997].

⇒ Aufgrund der besseren Empfindlichkeit wurde die Anreicherungszeit für quantitative Bestimmungen auf 30 min erhöht. Eine längere Anreicherungszeit war jedoch wegen der sich daraus ergebenden langen Analysenzeiten nicht realisierbar.

3.6.2.4 Rührgeschwindigkeit

Wie bereits in 3.6.1 diskutiert, hat die Durchmischung der Lösung einen entscheidenden Einfluss auf die Dicke der sich ausbildenden Verarmungsschicht um die Faser, und damit auf die Anreicherungszeit.

In den beschriebenen Versuchen wurde die Probenlösung standardmäßig mit einem Magnetrührer durchmischt. Von Nachteil dabei ist, dass ein Rührstäbchen direkt in die Lösung eingebracht werden muss, welches selbst Analyte an seiner Oberfläche adsorbieren kann. Dies wurde jedoch in den eigenen Untersuchungen selbst bei Messungen im Spurenbereich nicht beobachtet. In Vorversuchen wurde als alternative Durchmischungsmethode die sogenannte Agitationstechnik getestet. Die Methode beruht darauf, dass die SPME-Faser mittels eines Schwingkopfes in Vibration versetzt wird⁴. Am einfachsten ist dies mit einem elektrischen Rasierapparat zu verwirklichen. Problematisch bei der Agitation ist aber, dass die Faser einer relativ starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt ist, was in den eigenen Versuchen dazu führte, dass sie sehr schnell brach. Eine weitere Möglichkeit zur Durchmischung der Probenlösung besteht im Einsatz von Ultraschall. Ein unerwünschter Nebeneffekt ist hierbei allerdings die schlecht kontrollierbare Erwärmung der Probe, so dass diese Technik für weitere Messungen außer Acht gelassen wurde.

Für die Optimierungsversuche wurde ein Magnetrührer verwendet, dessen Rührgeschwindigkeit im Bereich von 0-1000 U/min variiert wurde (siehe 7.1.2.4). Wie aus der Abbildung 3.29 auf der nächsten Seite zu sehen, nahmen die Peakflächen mit Erhöhung der Rührgeschwindigkeit kontinuierlich zu, da pro Zeiteinheit mehr Analyte an die Faser-oberfläche gelangen.

⁴ Prinzip des SPME-Autosamplers der Fa. Varian

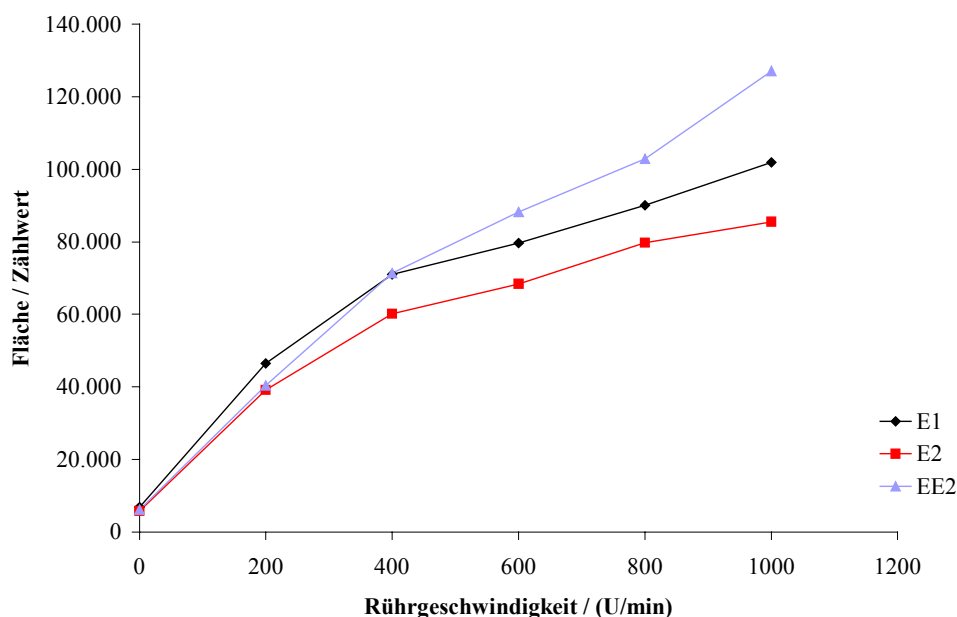


Abbildung 3.29: Abhängigkeit der Peakflächen von der Rührgeschwindigkeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, Rührgeschwindigkeit variabel, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

⇒ In allen Untersuchungen wurden die Proben stets mit der maximalen Rührgeschwindigkeit von 1000 U/min durchmischt.

3.6.2.5 Volumen

Das Analysenvolumen geht als Parameter in die Gleichung (9) ein und hat damit ebenfalls einen Einfluss auf die angereicherte Stoffmenge. Da es diesbezüglich oftmals zu Missverständnissen kommt bzw. viele Anwender den Einfluss des Volumens bei der Methodenentwicklung nicht berücksichtigen, stellte Gorecki diesen Zusammenhang anhand theoretischer Betrachtungen und experimenteller Befunde noch einmal deutlich heraus [GORECKI, 1997], [GORECKI, 1998B]. Die angereicherte Stoffmenge ist demnach nur in den seltensten Fällen vom Volumen unabhängig, nämlich bei sehr großem V_s und sehr kleinem K_{fs} .

Die im Rahmen der Versuche eingesetzten Volumina waren mit 3-50 ml relativ klein gewählt, so dass zunächst sicher von einer Volumenabhängigkeit der Anreicherung ausgegangen wurde.

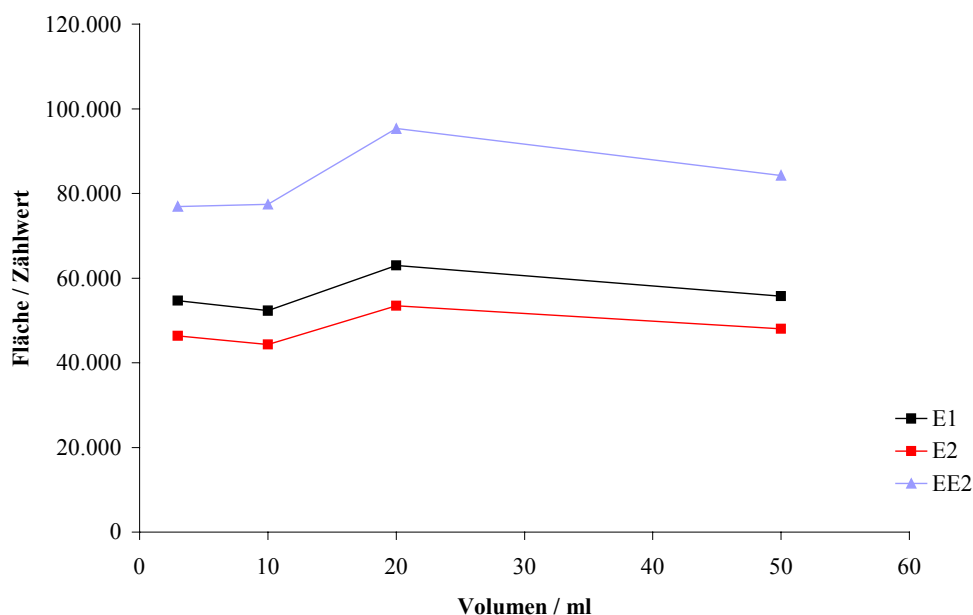


Abbildung 3.30: Abhängigkeit der Peakflächen vom Volumen der Anreicherungslösung 0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, Volumen variabel; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Eine Abhängigkeit der Peakflächen vom Volumen ist allerdings aus der Graphik nicht zu ersehen. Als Grund ist wahrscheinlich die kurze Anreicherungszeit von 15 min zu nennen. In dieser Zeit hat sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Faser und Lösung noch nicht eingestellt, so dass die angereicherten Stoffmengen erst einem Bruchteil der maximal anzureichernden Mengen entsprachen, und der Effekt der Volumenabhängigkeit (auch aufgrund der Messungenauigkeit) noch nicht zu erkennen war.

⇒ Für die folgenden Untersuchungen wurde das Anreicherungs volumen bei 3 ml belassen, da nur diese Menge mit dem gewählten Versuchsaufbau und unter Verwendung üblicher Autosamplervials praktikabel zu handhaben war.

3.6.2.6 pH-Wert

Der pH-Wert stellt eine wichtige Einflussgröße bei der Extraktion saurer oder basischer Analyte dar, da diese nur in ungeladener Form angereichert werden können. Die Estrogene sind aufgrund ihrer phenolischen OH-Gruppe als schwache Säuren aufzufassen mit pK_s -Werten von rund 10,7 [LEWIS, 1979]. Rein rechnerisch ergibt sich daraus, dass die

Estrogene bei $\text{pH} = \text{p}K_s - 2$ bereits zu 99% als freie Säure vorliegen. Es sollte daher ausreichend sein, wenn für die Anreicherung der Lösung ein pH-Wert nicht höher als 8 gewählt wird.

Zur Überprüfung wurden Anreicherungslösungen mit den pH-Werten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 hergestellt. Auf die Verwendung von Pufferlösungen musste verzichtet werden, da eine zusätzliche Beeinflussung der Anreicherung durch erhöhte Ionenkonzentrationen vermieden werden sollte (siehe 3.6.2.8). Die Lösungen wurden direkt durch Zugabe geringer Mengen Salzsäure oder Natronlauge auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

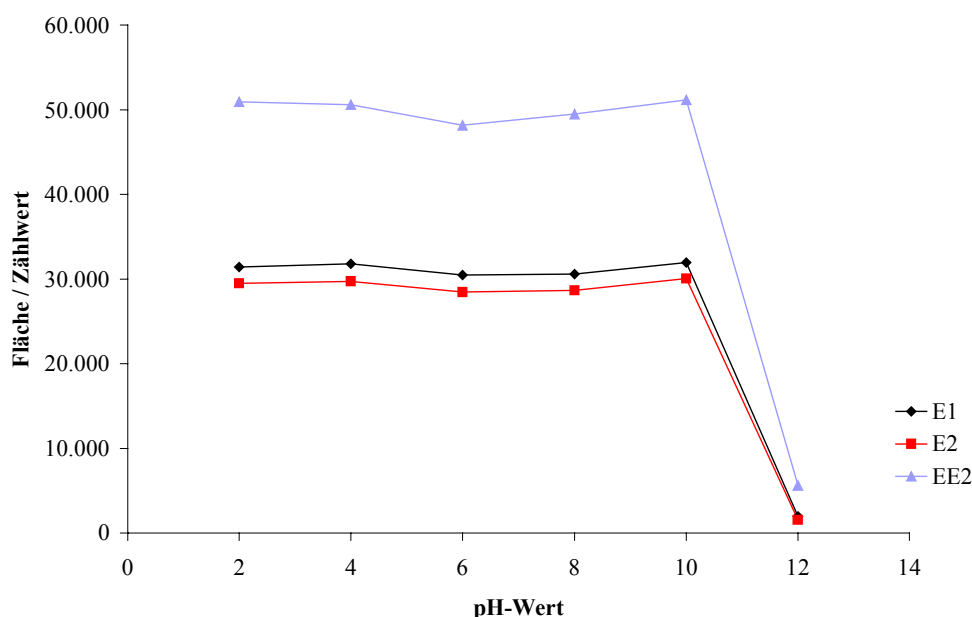


Abbildung 3.31: Abhängigkeit der Peakflächen vom pH-Wert

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., pH variabel, 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Die Graphik zeigt, dass die anhand der $\text{p}K_s$ -Werte getroffene Vorhersage mit der Praxis gut übereinstimmt.

⇒ Der pH-Wert der Anreicherungslösung wurde für die folgenden Untersuchungen auf einen Bereich von 6-8 eingestellt. Es wurde bewusst auf ein stärkeres Ansäuern der Proben verzichtet, um aus den Realproben nicht verstärkt Huminstoffe mit anzureichern, die die Lebensdauer und Effektivität der Faser mindern könnten.

3.6.2.7 Methanolgehalt

Ein Anteil an organischen Lösemitteln in der Probenlösung erhöht die Wasserlöslichkeit der Analyte und reduziert somit die angereicherten Stoffmengen. Es ist daher erstrebenswert, den Gehalt organischer Lösemittel möglichst niedrig zu halten.

Die zur Optimierung eingesetzten Anreicherungslösungen wiesen bereits einen Methanolgehalt von 1% (V/V) auf, der durch das Dotieren der Lösungen mit den Estrogenen zustande kam. Da das Vorkommen organischer Lösemittel aber auch in Realproben nicht auszuschließen ist, sollte der Einfluss verschiedener Methanolkonzentrationen auf die Anreicherung überprüft werden.

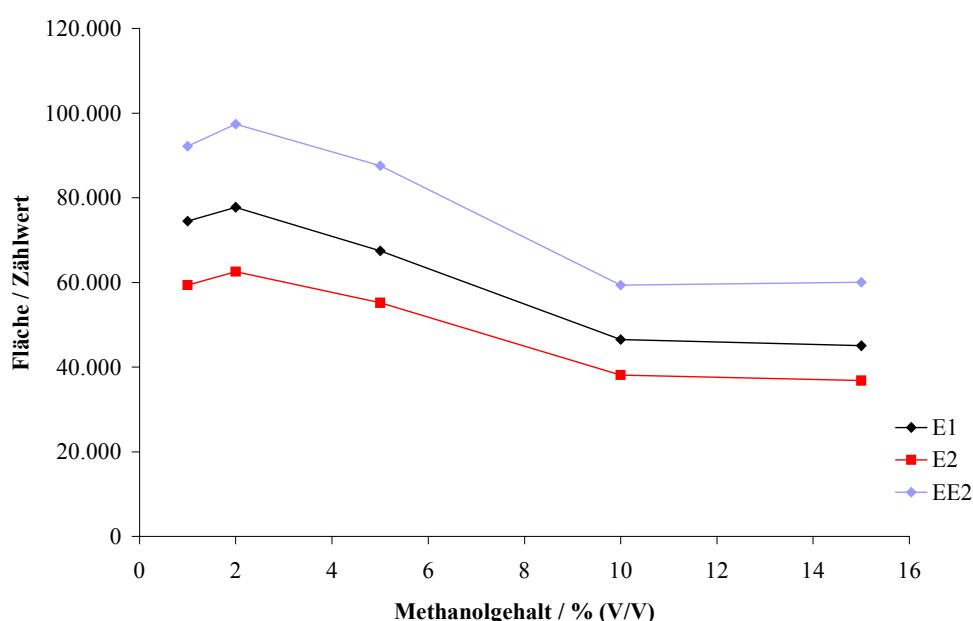


Abbildung 3.32: Abhängigkeit der Peakflächen vom Methanolgehalt

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., Methanolgehalt variabel; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Die Darstellung zeigt, dass bereits ein Methanolgehalt von 5% zu einem Rückgang der Peakflächen führte, der sich zumindest bis 10% auch weiter verstärkte.

⇒ Für die Herstellung der Anreicherungslösungen konnte auf eine Methanolzugabe nicht verzichtet werden. Der Methanolgehalt der Lösungen wurde daher standardmäßig auf 1% (V/V) eingestellt. Die Konzentration an organischen Lösemitteln in den Abwasserproben konnte im Rahmen der Arbeit nicht bestimmt werden.

3.6.2.8 Salzgehalt

Durch die Zugabe von Salzen zur Anreicherungslösung macht man sich den Aussalzeffekt zunutze und verdrängt organische Substanzen aus ihrer Hydrathülle, so dass sie verstärkt in die lipophilere Phase übertreten. In Vorversuchen zeigte eine Zugabe von Kochsalz zur Anreicherungslösung zunächst die zu erwartende Peakflächenzunahme. Doch bereits nach wenigen Messungen wurde für Ethinylestradiol im Chromatogramm kein Peak mehr detektiert, der Estron-Peak hatte sich dafür allerdings deutlich vergrößert. Der Effekt der NaCl-Zugabe sollte daraufhin noch einmal systematisch mit einer neuen Polyacrylat-Faser überprüft werden. Hierzu wurden Lösungen mit Salzgehalten von 0-33% (m/V) hergestellt und nach steigendem Salzgehalt vermessen. Zwischen den Anreicherungen wurde die Faser jeweils für 5 min in Aqua bidest. gespült. Im Anschluss an die hohen Konzentrationen wurden dann noch einmal die Lösungen mit 0% und 1% Salz vermessen. Die Ergebnisse sind dem Säulendiagramm zu entnehmen, die Reihenfolge der Messungen entspricht dabei der Darstellung von links nach rechts.

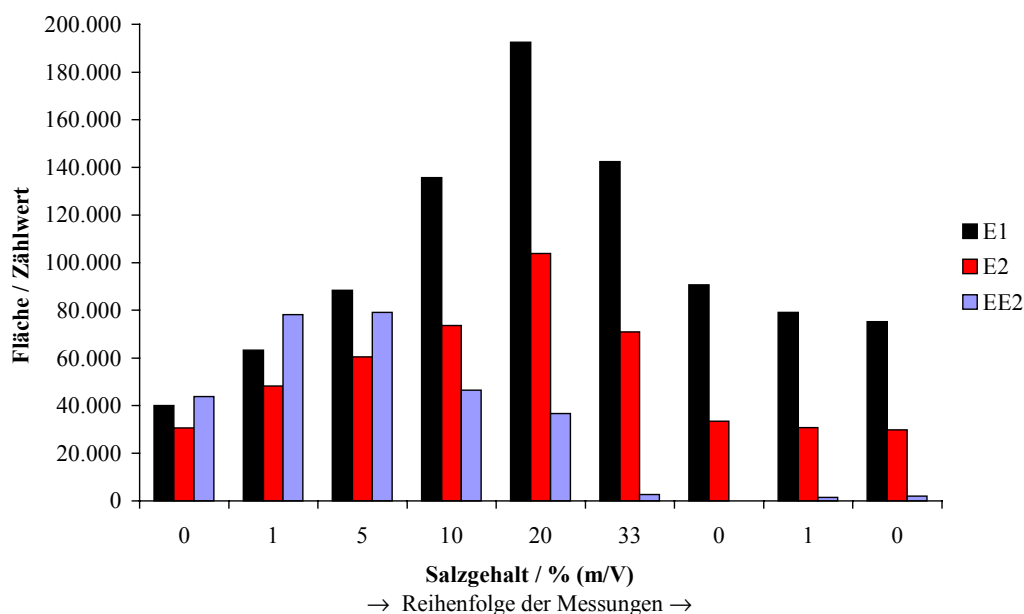


Abbildung 3.33: Abhängigkeit der Peakflächen vom Salzgehalt

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1%(V/V) Methanol, Salzgehalt variabel; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID

Nach Zugabe von 1% Salz ist zunächst die erwartete Intensitätszunahme für alle drei Estrogene zu sehen. Doch bereits ab der folgenden Messung bestätigt sich das Ergebnis der Vorversuche: Die Peakflächen von EE2 nehmen ab und die von E1 im Gegenzug

stetig zu. Bei 33%, dies entspricht in etwa einer gesättigten Kochsalz-Lösung, ist der EE2-Peak dann fast vollständig verschwunden. Die folgenden Messungen, die ohne bzw. mit 1% Salz durchgeführt wurden, zeigten praktisch keinen EE2-Peak mehr. Für E2 konnte dagegen zumindest bis zu einer Salzkonzentration von 20% die erwartete Peakflächenzunahme beobachtet werden.

Als Erklärung für die Abnahme der Peakflächen von EE2 unter gleichzeitiger Zunahme der Peakflächen von E1 ist die bereits in 3.3.1 beobachtete thermische Zersetzung des Ethinylestradiols anzuführen. Das Salz scheint die Abspaltung der Ethinylgruppe im Injektor noch katalytisch zu fördern. Probleme ähnlicher Art werden auch von Huppert et al. bei der Bestimmung von Ibuprofen mittels SPME beschrieben. Nach Anreicherungen aus salzhaltigen Lösungen beobachtete Huppert Salzablagerungen im Liner, auf der Golddichtung unterhalb des Liners und am Säulenanfang. Dies führte dazu, dass die Intensität des Ibuprofenpeaks zunächst sank bis dieser schließlich ganz aus den Chromatogrammen verschwand [HUPPERT, 1998].

Um für die eigenen Untersuchungen zu überprüfen, ob es sich um Salzablagerungen im GC oder auf der Faser handelte, wurde zum Vergleich wiederum eine neue Faser hinzugezogen. Nach Anreicherung einer Lösung ohne Salzzusatz lieferte die neue Faser im Gegensatz zur alten wieder den gewünschten EE2-Peak. Es wird daher vermutet, dass die Salzablagerungen sich hauptsächlich auf der Faser manifestierten. Möder et al. konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich beim Einsatz von Salz Kristalle auf der Faseroberfläche abscheiden. Möder nahm jedoch an, dass dies die Bestimmung nicht beeinflussen würde, da die Kristalle sich bei Kontakt mit Wasser sofort wieder lösen würden [MÖDER, 1997]. Die eigenen Messungen zeigten jedoch, dass auch durch intensives Spülen der Faser über mehrere Tage in heißem und kaltem Aqua bidest. die ursprüngliche Leistungsfähigkeit der Faser nicht wieder hergestellt werden konnte. Es wurde zwar wieder ein Peak für EE2 erhalten, allerdings fand immer noch eine deutliche Zersetzung zu E1 statt.

⇒ Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ein geringer Salzzusatz (1%) vermutlich einen positiven Einfluss auf die Anreicherung der Estrogene hat. Höhere Salzkonzentration führen allerdings zu einer Zersetzung des Ethinylestradiols. Da eine Salzzugabe aber auch die Fasereigenschaften verändert, wurde für alle folgenden Untersuchungen auf den Einsatz von Salz verzichtet.

Es muss jedoch angemerkt werden, dass Realproben auch gelöste Salze enthalten, und dadurch ähnliche Effekte, wie hier beobachtet, nicht auszuschließen sind.

3.6.2.9 Desorptionstemperatur

Die Wahl der Desorptionstemperatur hängt von der Flüchtigkeit und der thermischen Stabilität der Analyte ab. Da es sich bei den Estrogenen um sehr schwerflüchtige Verbindungen handelt, wurde die Desorptionstemperatur im Bereich von 280-320 °C variiert.

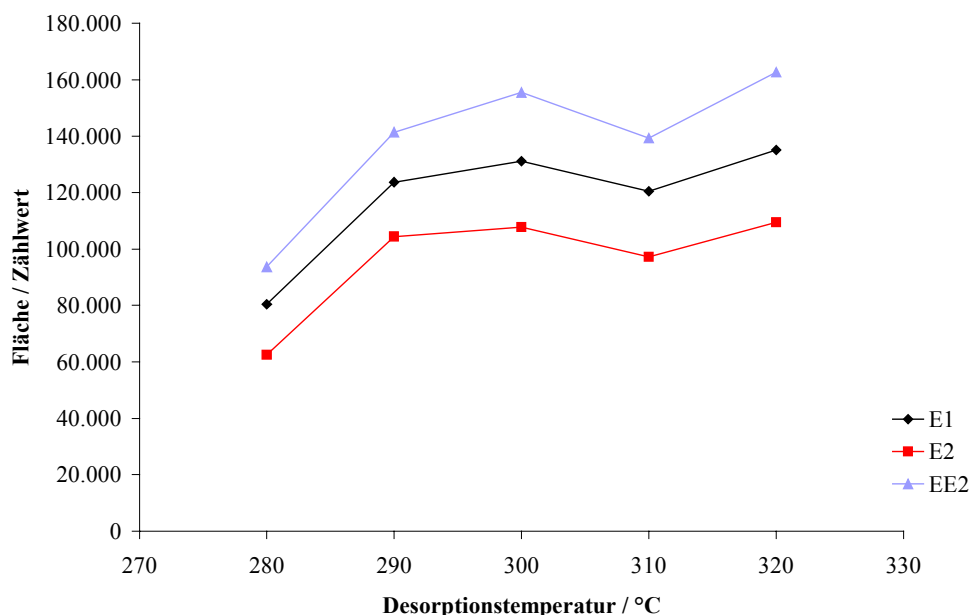


Abbildung 3.34: Abhängigkeit der Peakflächen von der Desorptionstemperatur

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorptionstemperatur variabel, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Die Kurven in der Graphik steigen bei einer Erhöhung der Injektortemperatur von 280 °C auf 300 °C zunächst an, sinken dann bei 310 °C noch einmal leicht ab, bevor sie zu 320 °C hin wieder ansteigen. Da der Abfall vermutlich auf Messwertschwankungen zurückzuführen ist, wurde davon ausgegangen, dass ab einer Temperatur von 290-300 °C praktisch keine Peakflächenzunahme mehr zu beobachten ist. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Desorptionstemperatur daher zunächst von 280 °C auf 300 °C erhöht. Die Messungen zeigten dann allerdings schnell, dass sich die Fasern schwarz färbten und an Empfindlichkeit einbüßten. Dies war so zunächst nicht zu erwarten gewesen, da laut Herstellerangaben der empfohlene Temperaturbereich der Polyacrylat-Phase bei 220-310 °C und die maximale Arbeitstemperatur bei 320 °C liegen sollte [SUPELCO, 1996]. Dazu schreibt jedoch Shirey in einem Buch zur SPME, dass die Polyacrylat-Fasern bei hohen Temperaturen (>250 °C) sehr oxidationsempfindlich seien, und daher

das Trägergas absolut sauerstofffrei sein müsse. Andernfalls färbe sich die Faser durch Oxidation schwarz und sei meist nach kurzer Zeit nicht mehr zu gebrauchen [SCHEPPERS WERCINSKI, 1999]. Auch Möder et al. konnten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen zeigen, dass bereits nach zehnmaliger Desorption bei 300 °C Veränderungen der Faseroberfläche zu beobachten waren [MÖDER, 1997].

⇒ Um die Lebensdauer der Faser zu verlängern, wurde die Desorptionstemperatur für alle folgenden Untersuchungen bei 280 °C belassen.

(Durch ein Ausheizen der Faser für weitere 5 min im Anschluss an die Desorption konnte eine Probenverschleppung sicher ausgeschlossen werden.)

3.6.2.10 Desorptionszeit

Während der Desorptionszeit sollten im Idealfall alle Probenmoleküle aus der Faser herausdiffundieren. Aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Estrogene wurden die Zeiten im Bereich von 1-5 min variiert. Wie aus der folgenden Abbildung zu sehen, stiegen die Peakflächen innerhalb der ersten 4 min zunächst kontinuierlich an, blieben dann jedoch praktisch konstant.

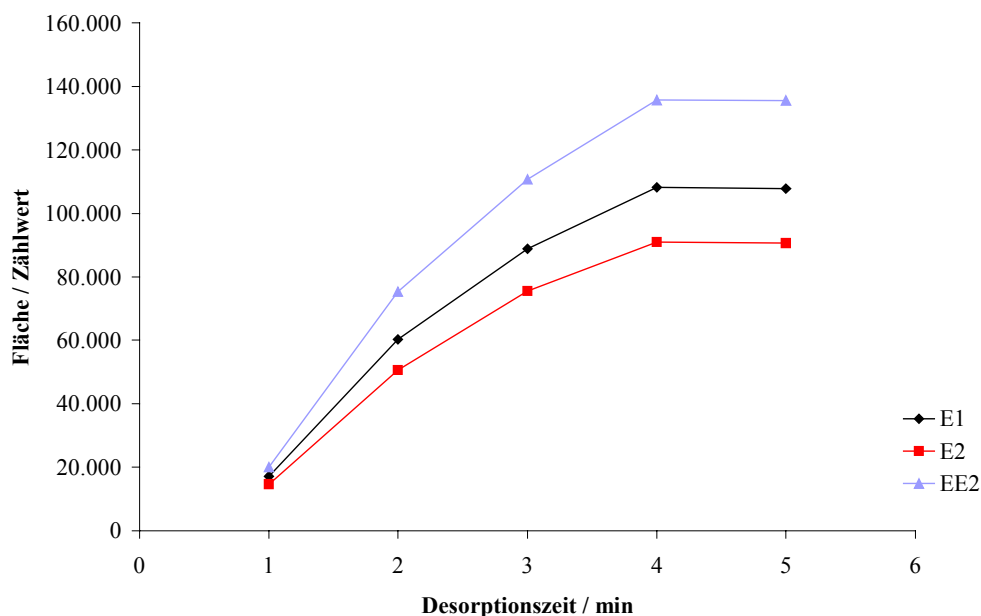


Abbildung 3.35: Abhängigkeit der Peakflächen von der Desorptionszeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; 280°C, Desorptionszeit variabel, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

Problematisch bei so langen Desorptionszeiten ist, dass es zu Peakverbreiterungen kommen kann, was sich dann negativ auf die Präzision und Nachweisgrenze der Methode auswirkt. Dies war hier jedoch nicht der Fall, da die Estrogene während der Dauer der Desorption bei 100 °C am Säulenanfang fokussiert wurden.

Eine Verkürzung der Desorptionszeit wäre durch den Einsatz schmalere Liner aufgrund der größeren linearen Strömungsgeschwindigkeit möglich gewesen. Hierauf wurde aber abgesehen von den quantitativen Bestimmungen verzichtet, da ein sehr schmaler Liner auch immer die Gefahr in sich birgt, dass die Faser während der Desorption mit der Wandung in Kontakt kommt, was dann wiederum die Lebensdauer der Faser verkürzt. Äußerst wichtig ist die Verwendung kleinvolumiger Liner allerdings bei der Bestimmung sehr flüchtiger Analyte [LANGENFELD, 1996].

⇒ Die Splitless-Zeit – und damit die effektive Desorptionszeit – betrug für alle weiteren Untersuchungen 5 min. Die Faser wurde im Anschluss noch für weitere 5 min bei offenem Split im Injektor belassen, um eine Probenverschleppung auszuschließen. Standardmäßig wurde mit einem 4 mm-Liner, einseitig zulaufend, gearbeitet. Für die quantitativen Bestimmungen kam ein gerader 2 mm-Liner zum Einsatz.

3.6.3 ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNGSVERSUCHE

Ein Problem bei der Beurteilung der Ergebnisse bestand wie bei der LLE oder SPE in der Streuung der Messwerte, da die Effekte zunächst unabhängig von einem internen Standard beobachtet werden sollten bzw. mussten. Dadurch war es teilweise schwierig, sichere Aussagen bezüglich optimaler Versuchsbedingungen zu treffen.

Um die Präzision der SPME-Methode zu bestimmen, wurden sechs Proben der Konzentration 0,5 mg/l unter den gleichen Bedingungen, in dem Fall den Standardbedingungen, angereichert und analysiert. Die Messwerte sind im Anhang angegeben (8.1.7). Die Auswertung ergab Variationskoeffizienten um die 10% für die untersuchten Estrogene (E1: $V_k=9,5\%$, E2: $V_k=8,3\%$, EE2: $V_k=10,3\%$). Die Werte liegen in der Größenordnung von Literaturangaben. Nilsson et al. ermittelten z.B. in einem Ringversuch für die Bestimmung von VOCs relative Standardabweichungen von rund 10% und für die Herbizid-Bestimmung relative Standardabweichungen von 6-14% jeweils unter Wiederholbedingungen [NILSSON, 1997], [FERRARI, 1998]. Die Präzision hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab. Werden z.B. sehr niedrige Konzentrationen vermessen, so führt dies in der Regel zu einer schlechteren Präzision. Ebenso kann durch die Wahl der Versuchsbedingungen die Präzision beeinflusst werden. Für die eigenen Messungen sind die folgenden

Fehlerquellen mit direktem Einfluss auf die Präzision zu nennen, die zum Teil auch in der manuellen Durchführung der Anreicherung ohne Verwendung eines Autosamplers begründet sind:

- Zeitnahme

Die Anreicherungszeit wurde manuell mit Hilfe eines Kurzzeitweckers kontrolliert. Kleine Abweichungen in der Zeitnahme haben einen Einfluss auf die angereicherten Stoffmengen.

- Temperaturkonstanz

Die Temperatureinstellung erfolgte wie in Abbildung 3.25 zu sehen über ein Wasserbad und wurde zunächst mittels eines externen Thermometers, später dann über ein Kontaktthermometer kontrolliert. Die Temperaturschwankungen lagen bei Verwendung des externen Thermometers im Bereich von $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei Verwendung des Kontaktthermometers im Bereich von $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Konstanz der Rührgeschwindigkeit

Zur Durchmischung der Lösung wurde ein Magnetrührer verwendet. Die Effektivität des Rührens ist hierbei nicht immer gleich, da sie auch von der Position der Faser in der Lösung abhängt. Durch das manuelle Einstechen der Faser ist diese Position nicht exakt reproduzierbar.

- Thermische Instabilität des Ethinylestradiols

Auch bei der SPME kommt es zu einer thermischen Zersetzung des Ethinylestradiols, die durch Zugabe von Salz zur Analysenlösung noch verstärkt wird (siehe 3.6.2.8). Als Produkt entsteht Estron, was jedoch selbst in den Proben mittels SPME bestimmt werden sollte. Um den Fehler für die Estronbestimmung abschätzen zu können, wurde eine EE2-Lösung der Konzentration 0,5 mg/l angereichert und bei 280 °C bzw. 300 °C im Injektor desorbiert. Das entstandene E1 wurde jeweils als prozentualer Flächenanteil bezogen auf EE2 angegeben. Die Messwerte sind ebenfalls im Anhang 8.1.7 angegeben. Bei einer Desorptionstemperatur von 280 °C wurden im Mittel 1,23% und bei 300 °C 1,44 % Estron erhalten. Da die Injektortemperatur im Rahmen der Optimierungsversuche für alle Messungen, außer denen zur Variation der Desorptionstemperatur, konstant 280 °C betrug und der prozentuale Anteil an entstandenem E1 relativ gering war, wurde der Fehler für die Methodenentwicklung als vernachlässigbar angesehen. Es wurde allerdings darauf geachtet werden, dass der Liner möglichst immer frei von Gummistücken war, da diese die Zersetzung von Ethinylestradiol fördern. Die Gummistücke werden beim Einstechen der SPME-Faser in den Injektor aus dem Septum ausgestanzt. Um diese zusätzliche Fehlerquelle zu

minimieren, wurden Septum und Liner jeden Tag kontrolliert bzw. erneuert. Vollständig umgehen läßt sich dieses Problem nur durch die Verwendung eines septumfreien Aufgabesystems, z.B. eines Merlin Microseals™, das jedoch für die hier durchgeführten Versuche nicht zur Verfügung stand.

- Tailing

Dass die Estrogene unterivatisiert keine idealen Analyte für die Gaschromatographie sind, wurde bereits besprochen (3.3.1). Problematisch ist dabei das Tailing, was dazu führte, dass E1 und E2 nicht basisliniengetrennt waren. Die Folge sind Fehler in der Peakerkennung und Integration.

Schließlich ist noch anzumerken, dass alle Versuchsparameter ausgehend von Standardbedingungen jeweils unabhängig voneinander optimiert wurden. Dies stellt eine vereinfachte Vorgehensweise dar. Die Wahl einer anderen Standard-Anreicherungstemperatur (als 40 °C) hätte sicherlich andere optimale Anreicherungszeiten zur Folge gehabt, ebenso wie eine andere Standard-Desorptionstemperatur (als 280 °C) auch andere Desorptionszeiten bewirken würde. Um diese gegenseitigen Einflüsse überprüfen zu können, hätten jedoch wesentlich mehr Messungen durchgeführt werden müssen, was aufgrund des großen zeitlichen Aufwandes und des Verbrauches an SPME-Fasern nicht gerechtfertigt schien.

Die ursprüngliche Zielstellung der SPME-Optimierung bestand darin, die erhaltenen Peakflächen zu maximieren, um eine Methode zu erhalten, die für die Spurenanalytik der Estrogene geeignet ist. Aus praktischen Gründen mussten hier jedoch deutliche Abstriche mit Rücksicht auf die Lebensdauer der Faser und die Analysenzeit gemacht werden. Die letztendlich „optimierten Bedingungen“ unterscheiden sich daher nur geringfügig von denen der Optimierung zugrunde gelegten Standardbedingungen (Änderungen fett gedruckt).

Optimierte SPME-Bedingungen:

Anreicherung

Volumen:	3 ml
Anreicherungstemperatur:	60 °C
Anreicherungszeit:	30 min
Rührgeschwindigkeit:	1000 U/min
pH-Wert:	≤ 8
MeOH-Gehalt:	1% (V/V)
Salz:	keine Zugabe

Desorption

Desorptionstemperatur:	280 °C
Desorptionszeit:	5 min + weitere 5 min bei offenem Split
Liner:	2 mm gerade

3.6.4 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH SPME

Im theoretischen Teil wurde als Grundlage für quantitative SPME-Bestimmungen die Gleichung (5) genannt, die aber voraussetzt, dass die Anreicherung bis zur Einstellung des Konzentrationsgleichgewichtes erfolgt. Ai konnte jedoch zeigen, dass quantitative Bestimmungen auch vor Erreichen des Gleichgewichtes möglich sind, wenn auf die exakte Einhaltung der Versuchsbedingungen geachtet wird [Ai, 1997]. Dieses Vorgehen wurde bereits im Rahmen der Optimierungsversuche realisiert und sollte nun auch auf die quantitative Bestimmung angewendet werden.

Die Anreicherung erfolgte unter Verwendung der optimierten SPME-Parameter. Ethinyl-estradiol wurde aufgrund der möglichen Vortäuschung erhöhter Estrongehalte nicht in die Messungen mit einbezogen. Allen Lösungen wurde Estradiol- d_2 als interner Standard in einer Konzentration von 2 ppb (2 µg/l) zugesetzt. Zur Aufnahme der Kalibrierkurven wurden Anreicherungs-lösungen in Aqua Bidest. im Konzentrationsbereich von 1-10 ppb (1-10 µg/l) hergestellt. Jede Konzentration wurde zweimal angereichert und vermessen. Die Quantifizierung der Proben erfolgte am GC/MS im SIM-Modus nach Integration der gemessenen Ionenspuren, die Flächen wurden auf den internen Standard bezogen. Die Messbedingungen und Arbeitsanweisungen zur Herstellung der Lösungen sind im experimentellen Teil angegeben (7.1.2.4, 7.1.2.6 und 7.2). Die vollständigen Messwerte unter Angabe des linearen Ausgleichs finden sich im Anhang 8.1.8.

Die Kalibrierkurven für E1 und E2 sind auf der nächsten Seite angegeben (Abb. 3.36a und b). Im Gegensatz zur direkten GC-Bestimmung der Estrogene mittels MS (siehe 3.3.2) wurde hier ein linearer Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und vorliegender Analysenkonzentration gefunden. Über das Signal-Rausch-Verhältnis wurde für E1 und E2 eine BG (S/N=10:1) von 2 ppb (2 µg/l) und eine NG (S/N=3:1) von 500 ppt (500 ng/l) ermittelt. Eine Sechsfach-Anreicherung einer 10 ppb Lösung (Estradiol- d_2 : 2 ppb) diente der Bestimmung der Präzision. Ohne Berücksichtigung des zugesetzten internen Standards wurde direkt aus den Flächenwerten für E1 ein Vk von 6,0% und für E2 ein Vk von 5,2% berechnet. Der Bezug auf den internen Standard verbesserte den Vk für E1 auf 4,6% und für E2 auf 4,0% (Wertetabelle siehe 8.1.8).

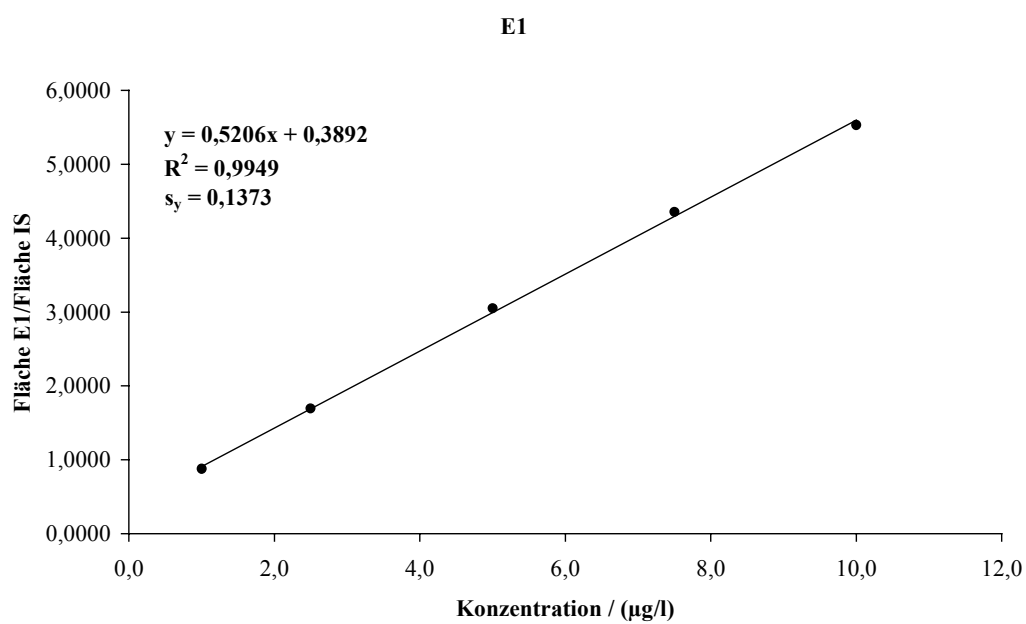


Abbildung 3.36a: Kalibriergerade für **Estron**: 1-10 µg/l (d_2 -E2: 2 µg/l), Aqua bidest., GC/MS

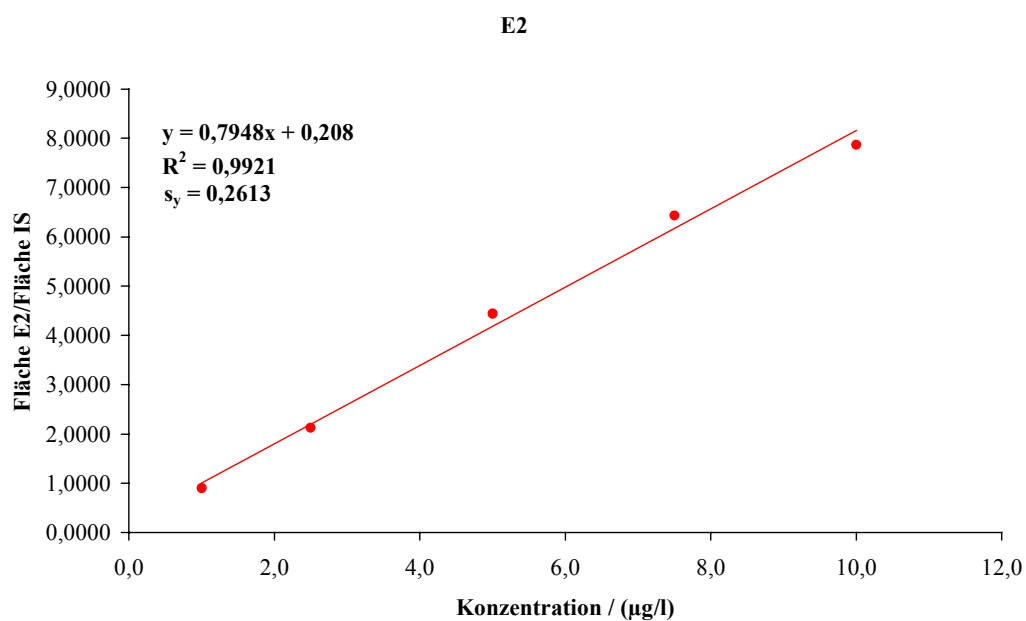


Abbildung 3.36b: Kalibriergerade für **Estradiol**: 1-10 µg/l (d_2 -E2: 2 µg/l), Aqua bidest., GC/MS

Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind für die in Realproben zu erwartenden Konzentrationen im unteren ppt-Bereich allerdings zu hoch. Um die SPME dennoch für die Bestimmung der Estrogene im Abwasser nutzen zu können, musste versucht werden, die Bestimmungsgrenze weiter zu senken. Neben der Einführung eines Derivatisierungsschrittes wurde auch eine Mehrfachanreicherung der Analyte an der Faser erprobt.

3.6.5 MEHRFACHANREICHERUNG

Da die SPME auf der Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen Faser und Lösung beruht, wird in der Praxis oftmals keine vollständige Extraktion der Analyte erzielt. Im Rahmen der Arbeit musste die Anreicherung aus Zeitgründen auch stets vor Erreichen des Gleichgewichtes abgebrochen werden, was gerade im Hinblick auf die Spurenanalytik zu deutlichen Empfindlichkeitsverlusten führt. Wie aus Abb. 3.28 (Anreicherungszeit) zu ersehen, wäre z.B. durch eine Verlängerung der Anreicherungszeit von bisher 30 min auf 90-120 min eine Verdopplung der angereicherten Stoffmenge zu erzielen gewesen.

Um die Effektivität der Anreicherung zu steigern und zugleich die Analysenzeit möglichst gering zu halten, wurde eine Mehrfachanreicherung erprobt. Statt einer einzelnen Anreicherung über einen relativ langen Zeitraum werden bei einer Mehrfachanreicherung mehrere, zeitlich kürzere Anreicherungen in Folge durchgeführt. Die Probenlösung wurde für jeden Anreicherungs-schritt erneuert, um Empfindlichkeitsverluste durch Verarmungseffekte ausschließen zu können. Der Vorteil einer solchen Mehrfachanreicherung besteht darin, dass man sich den zu Beginn der Anreicherung steileren Verlauf des Extraktions-Zeit-Profiles (Abb. 3.28) zunutze macht, und dadurch mit drei Anreicherungen über 10 min oder sechs Anreicherungen über 5 min effektiv mehr Masse extrahieren kann als mit einer einzelnen Anreicherung über 30 min. Zwischen den Anreicherungen wird die Faser wie üblich im Injektor des GC desorbiert, der GC-Lauf jedoch nicht gestartet. Die Analyte werden am Säulen-anfang fokussiert bis die Mehrfachanreicherung abgeschlossen ist.

Lipinski erprobte den Einsatz der Mehrfachanreicherung zur Verbesserung der Nachweisgrenze für die Pestizidanalytik. Im Vergleich zu einer einmaligen Anreicherung über 40 min konnte er durch eine Vierfach-Anreicherung über jeweils 30 min die Nachweisgrenzen seiner Methode um den Faktor 3-10 senken [LIPINSKI, 2000]. Da Lipinski die Gesamtanreicherungszeit jedoch nicht gleich wählte, ist der tatsächliche Gewinn durch die Mehrfachanreicherung so nicht zu erkennen.

Für Estron und Estradiol sollte die Standardanreicherung über 1 x 30 min mit einer Mehrfachanreicherung über 3 x 10 min bzw. 6 x 5 min verglichen werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt:

Tabelle 3.2: Mehrfachanreicherung der Estrogene

0,1mg/l E1/E2, 3ml; SPME-Standardbedingungen, GC/FID; Angabe in Flächeneinheiten

	E1		E2	
	Fläche	Faktor	Fläche	Faktor
1 x 30 min	34.841	1,0	28.122	1,0
3 x 10 min	49.206	1,4	41.809	1,5
6 x 5 min	71.607	2,1	60.676	2,2

Eine Aufsplittung der Anreicherungszeit von 30 min auf 3 x 10 min erhöhte die Peakflächen um ca. den Faktor 1,5, wohingegen die Anreicherung über 6 x 5 min praktisch zu einer Verdoppelung der Peakflächen führte. Da zur reinen Anreicherungszeit aber auch die Desorptionsschritte mit hinzugerechnet werden müssen, verlängert sich bei einer Mehrfachanreicherung die Gesamtanalysendauer auch entsprechend. Statt 40 min für eine Einfachanreicherung (30 min Anreicherung + 10 min Desorption) werden für eine Dreifachanreicherung 60 min (3 x 10 min Anreicherung + 3 x 10 min Desorption) und für eine Sechsfachanreicherung sogar 90 min (6 x 5 min Anreicherung + 6 x 10 min Desorption) benötigt. Da aber wie bereits oben anführt auch durch eine Einfachanreicherung über 90-120 min eine Verdopplung der Peakflächen erzielt wird, ist der Nutzen einer solchen Mehrfachanreicherung hier eher gering.

Werden jedoch Analyte angereichert, für die sich das Verteilungsgleichgewicht an der Faser schneller einstellt, so ist die Mehrfachanreicherung eine gute Möglichkeit zur Verbesserung von Empfindlichkeit und Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode. Man darf aber nicht außer Acht lassen, dass eine Mehrfachanreicherung immer mit einer Verschlechterung der Präzision einhergeht. Oftmals sinkt auch die Selektivität der Methode, da Stör- und Begleitstoffe ebenfalls verstärkt mit extrahiert werden.

3.6.6 DERIVATISIERUNG

Da die Estrogene ohne vorhergehende Derivatisierung nur schlecht GC-gängig sind, und außerdem die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode für die Spurenanalytik nicht ausreichend sind, sollte nun auch im Rahmen der Festphasenmikroextraktion die Möglichkeit einer Derivatisierung erprobt werden.

Die ersten Versuche zur Derivatisierung in Kombination mit der SPME gehen auf eine Arbeit von Pan und Pawliszyn zur Fettsäureanalytik zurück [PAN, 1997]. Prinzipiell bieten sich drei Vorgehensweisen an, die in der folgenden Abbildung in einer Übersicht dargestellt sind:

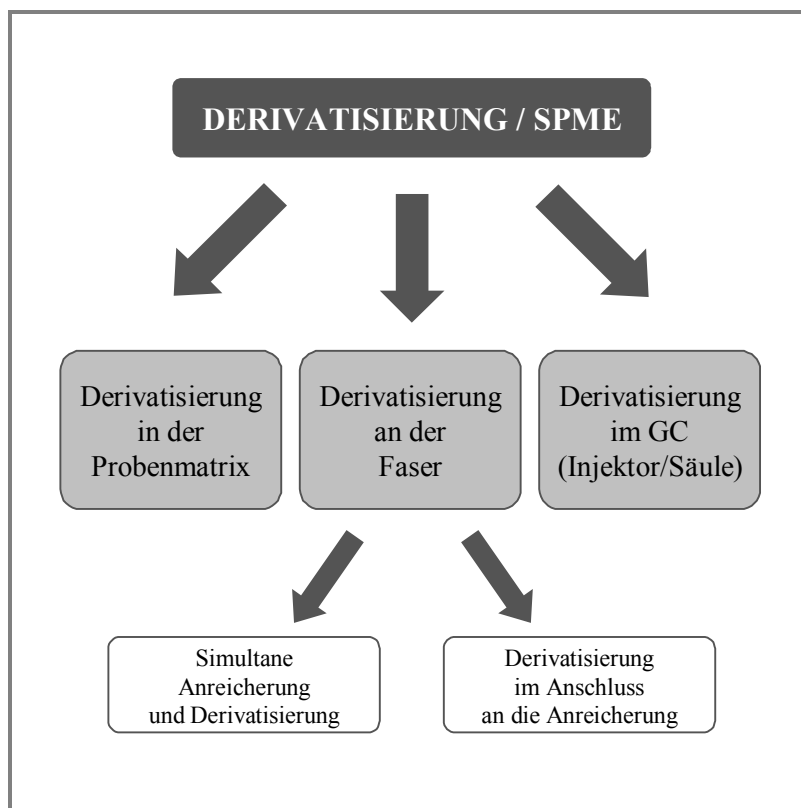


Abbildung 3.37: Möglichkeiten der Derivatisierung in Kombination mit einer SPME-Anreicherung (Schema nach PAN, 1997)

Die Silylierung hatte sich in 3.3.3 als geeignete Methode zur direkten Derivatisierung der Estrogene erwiesen und sollte nun auch bei der SPME zum Einsatz kommen. Da die Silylierungsreagenzien jedoch, ebenso wie die entstehenden Trimethylsilylderivate, sehr hydrolyseempfindlich sind, kommen als mögliche Derivatisierungstechniken nur die Derivatisierung an der Faser im Anschluss an die Extraktion oder die Derivatisierung direkt im Gaschromatographen in Frage.

3.6.6.1 Derivatisierung nach der Anreicherung direkt an der Faser

Zur Derivatisierung an der Faser wird diese nach erfolgter Immersion in einem zweiten Schritt mit dem Derivatisierungsreagenz in Kontakt gebracht. Um die Faser durch die aggressiven Reagenzien nicht unnötig zu schädigen, erfolgt die Umsetzung als Head-

space-Derivatisierung in der Gasphase über der Reagenzlösung. Die derivatisierten Analyte werden im Anschluss im heißen Injektor desorbiert und gaschromatographisch bestimmt. Okeyo konnte eine entsprechende Methode unter Verwendung von BSTFA bereits erfolgreich zur Steroidanalytik einsetzen [OKEYO, 1997].

Für die eigenen Untersuchungen erfolgte die Wahl des Derivatisierungsmittels wieder ausgehend von MSTFA, das vielfach als Nachfolgereagens von BSTFA angesehen wird und in seiner Reaktivität mit diesem vergleichbar ist. Es wurde bewusst nicht gleich die Reagenzmischung aus MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4), die sich ja für die direkte Derivatisierung der Estrogene bewährt hatte (3.3.3.2), eingesetzt, da das enthaltene Iod-trimethylsilan ein sehr aggressives und korrosives Reagenz darstellt, welches eine Schädigung der Faserbeschichtung bewirken könnte. Die Analyte wurden entsprechend der SPME-Standardbedingungen (40 °C, 15 min) angereichert. Es folgte dann die Derivatisierung in der Gasphase mit 3 µl des Derivatisierungsreagenzes bei 80 °C für 30 min und im Anschluss daran die gaschromatographische Bestimmung mittels GC/MS im Scan-Modus (siehe 7.1.2.4 und 7.2). Estriol wurde in die Untersuchungen mit einbezogen. Wenn keine Peaks der Originalsubstanzen oder Zwischenprodukte mehr im Chromatogramm beobachtet wurden, wurde die Umsetzung als vollständig erachtet. Die Messungen erfolgten ohne Zusatz eines internen Standards. Das Vorgehen entsprach ansonsten dem Vorgehen in Kapitel 3.3.3.2.

Der Einsatz von reinem MSTFA erwies sich wie bei der direkten Derivatisierung der Estrogene erneut als problematisch. Neben dem erwünschten EE2-TMS(2)-Derivat wurden für Ethinylestradiol zusätzliche Peaks im Totalionenstromchromatogramm erhalten.

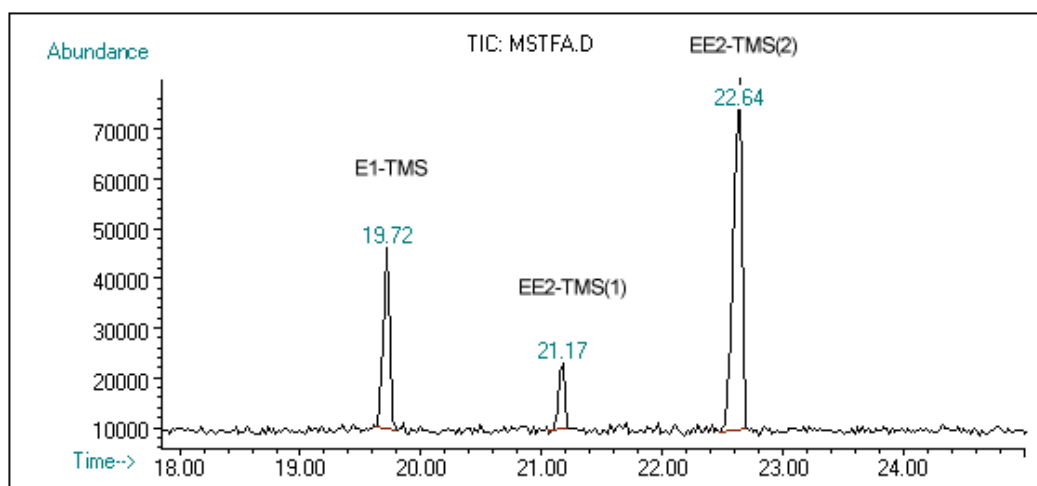


Abbildung 3.38 a: 0,5 mg/l EE2; Headspace-Derivatisierung mit MSTFA 80 °C, 30 min Standardbedingungen SPME

Der erste Peak (Rt: 19.72 min) entspricht E1-TMS, das durch Abspaltung der Ethinylgruppe im heißen Injektor entsteht. Dem zweiten Peak (Rt: 21.17 min) konnte anhand des Massenspektrums eine Molmasse von 368 zugeordnet werden (Abb. 3.38b).

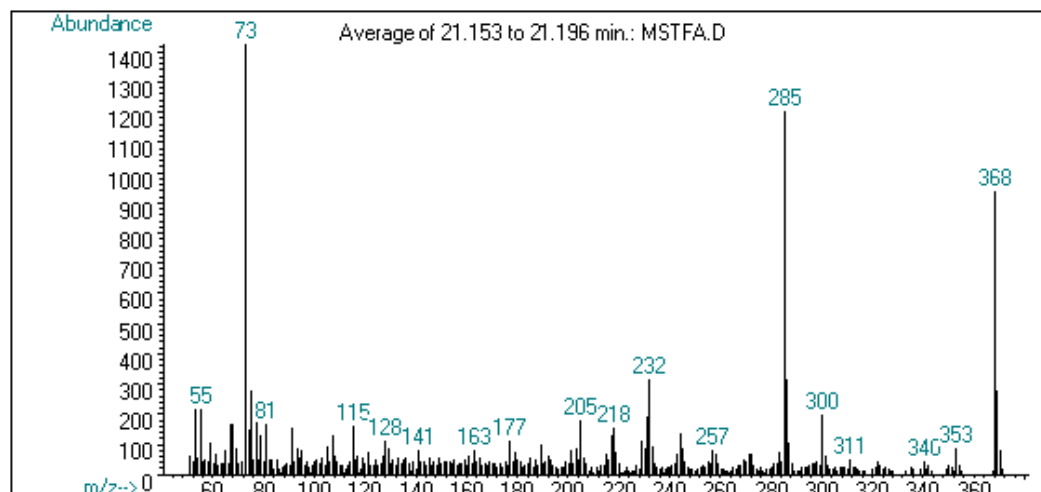


Abbildung 3.38b: Spektrum des Peaks **EE2-TMS(1)** aus obigem TIC

Dies entspricht formal dem einfach silylierten Ethinylestradiol. Geht man von der Reaktivität der Hydroxygruppen aus, so sollte es sich hierbei um das an der alkoholischen OH-Gruppe silylierte Derivat handeln, da die alkoholische OH-Gruppe schneller als die phenolische OH-Gruppe umgesetzt wird [KNAPP, 1979]. Da die alkoholische Hydroxygruppe aber durch die Ethinylgruppe sterisch abgeschirmt ist, entspricht der Peak eher der an der phenolischen OH-Gruppe silylierten Verbindung, die dann unter Abspaltung der Ethinylgruppe zum Estronderivat weiterreagiert. Die Beobachtung dieses Zwischenproduktes würde für schonendere Bedingungen bei der SPME-Desorption im Vergleich zur direkten Injektion der Probe sprechen.

Estron und Estradiol wurden unter den gewählten Bedingungen zu E1-TMS und E2-TMS(2) umgesetzt. Die Derivatisierung von Estriol gelang dagegen nicht.

Da das Ziel auch hier eine vollständige und zu einheitlichen Produkten verlaufende Derivatisierung aller vier Estrogene war, wurde durch Katalysatorzusatz versucht, die Reaktionsfähigkeit des MSTFA zu erhöhen. Ein Anteil von 1% TMSIM in MSTFA lieferte die gewünschten Derivate für E1, E2 und EE2. Estriol konnte jedoch auch mit deutlich höheren TMSIM-Anteilen (bis zu 10%) nur unvollständig derivatisiert werden. Da E3 bei direkter Reaktion mit MSTFA sehr schnell zu E3-TMS(3) umgesetzt wurde (3.3.3.2), war dies so nicht zu erwarten gewesen. Den Grund in der höheren Polarität des Estriols gegenüber den anderen Estrogenen und einer damit verbundenen schlechteren Anreicherung an der Polyacrylat-Phase zu suchen, scheint unwahrscheinlich, da in der Literatur auch

SPME-Anreicherungen des gut wasserlöslichen Phenols und seiner chlorierten Derivate und Nitroderivate beschrieben sind [BUCHHOLZ, 1994]. Eventuell wird aber Estriol durch adsorptive Wechselwirkungen so fest an die Polyacrylatphase gebunden, dass eine Derivatisierung der OH-Gruppen praktisch nicht oder nur sehr langsam erfolgen kann. Mit Rücksicht auf die Faserlebensdauer sollte allerdings auf den Einsatz stärkerer Silylierungsgemische verzichtet werden, so dass die Bestimmung des Estriols mittels SPME nicht weiter verfolgt wurde.

Zum Vergleich wurden die Derivatisierungen noch einmal entsprechend der Arbeit von Okeyo [OKEYO, 1997] mit BSTFA und ergänzend dazu auch mit TMSIM-Zusatz durchgeführt. Die Verwendung von BSTFA hatte jedoch keine Vorteile gegenüber MSTFA. Als Reagenz zur Derivatisierung an der Faser wurde daher für alle folgenden Messungen MSTFA mit 1% TMSIM verwendet.

Ein entscheidendes Problem beim Einsatz der Methode für quantitative Untersuchungen stellte die schlechte Reproduzierbarkeit der Messungen dar, da vereinzelt neben den TMS-Derivaten auch deren Hydrolyseprodukte bzw. nicht derivatisierte Verbindungen im Chromatogramm auftraten. Die folgenden Chromatogramme zeigen eine „gelungene“ Derivatisierung (Abb. 3.39a) und eine „misslungene“ Derivatisierung (Abb. 3.39b) in Gegenüberstellung.

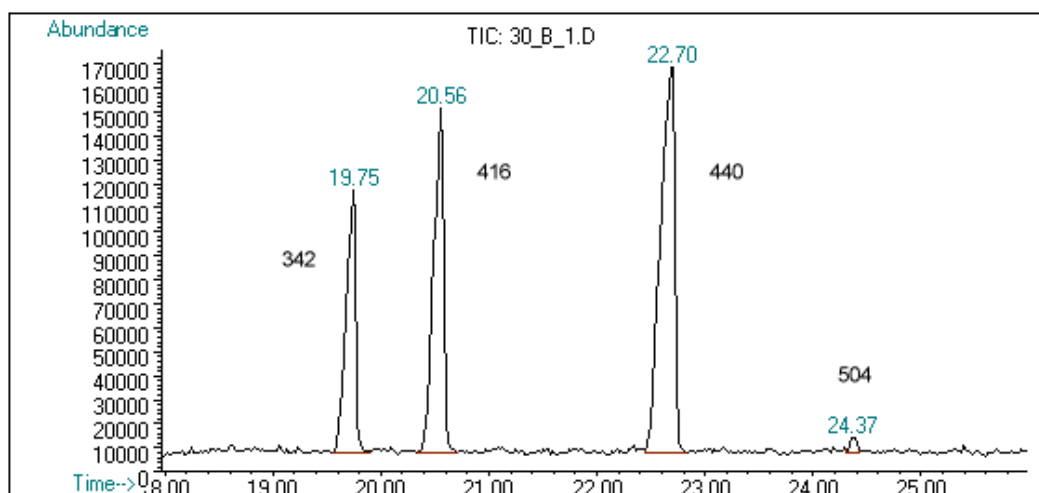


Abbildung 3.39a: 0,5 mg/l E1, E2, EE2, E3; Headspace-Derivatisierung mit MSTFA (1% TMSIM) 80 °C, 30 min

E1-TMS: $m/z=342$; E2-TMS(2): $m/z=416$; EE2-TMS(2): $m/z=440$; E3-TMS(3): $m/z=504$

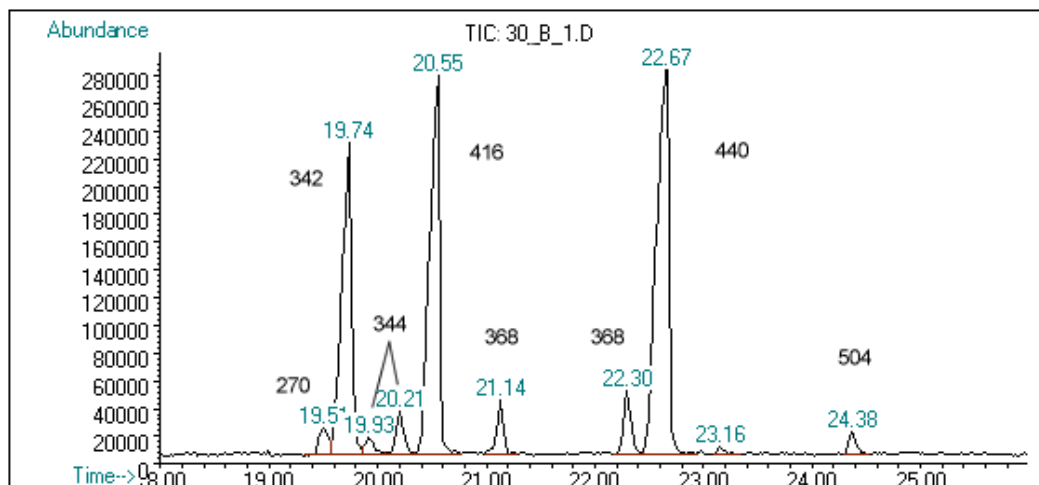


Abbildung 3.39b: gleiche Bedingungen wie Abb. 3.38a, Faser war hier jedoch feucht!

E1: $m/z=270$; E1-TMS: $m/z=342$; E2-TMS(1): $m/z=344$; E2-TMS(2): $m/z=416$; EE2-TMS(1): $m/z=368$; EE2-TMS(2): $m/z=440$; E3-TMS(3): $m/z=504$

Die Ursache für die misslungene Derivatisierung lag offensichtlich darin, dass die Faseroberfläche in Abb. 3.39b noch eine gewisse Restfeuchtigkeit an ihrer Oberfläche aufwies, was zu der unvollständigen Umsetzung führte. Durch die Einführung eines zusätzlichen Trockenschrittes konnte dieses Problem behoben werden. Die SPME-Faser wurde dazu im Anschluss an die Anreicherung zunächst für 10 min bei 100 °C im Injektor eines Gaschromatographen oder im Umlufttrockenschrank getrocknet, bevor anschließend die Headspace-Derivatisierung erfolgte.

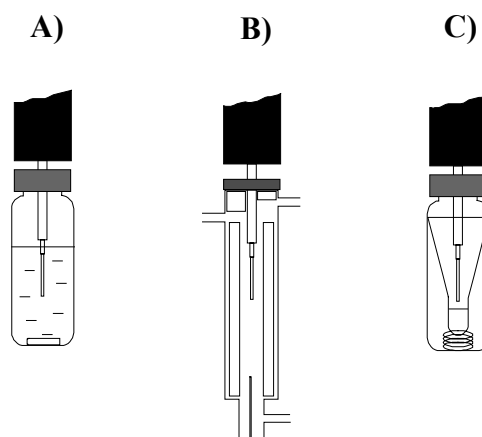


Abbildung 3.40: Derivatisierungsschema

A) Anreicherung; B) Trocknen der Faser im Injektor; C) Headspace-Derivatisierung

Abgesehen von der richtigen Reagenzzusammensetzung spielt für eine quantitative Umsetzung natürlich auch die Derivatisierungszeit und -temperatur sowie das Reagenz-

volumen eine Rolle. Da die als Ausgangspunkte gewählten Bedingungen für die Head-space-Derivatisierung (30 min, 80 °C, 3 µl) bereits die gewünschten Derivate für E1, E2 und EE2 lieferten, schien eine weitere Optimierung nicht erforderlich. Mit Hinblick auf den Einsatz der Methode zur Routineanalytik wäre es jedoch wünschenswert, die Analysenzeit insgesamt zu verkürzen bzw. die gesamte Analysenprozedur zu automatisieren.

3.6.6.2 Derivatisierung nach Desorption im GC

Eine einfachere und schnellere Methode der Derivatisierung für die SPME stellt die Umsetzung mit einem Derivatisierungsreagenz direkt im Liner bzw. in der Säule des Gaschromatographen dar. Dazu werden die Analyte zunächst von der Faser desorbiert und im Anschluss daran das Derivatisierungsmittel direkt in den GC eingespritzt. Problematisch ist hierbei, dass die Reaktionszeit in der Regel relativ kurz ist. Die Reagenzien müssen daher sehr reaktionsfreudig sein, um die Analyte innerhalb kürzester Zeit vollständig zu derivatisieren. Helaleh et al. beschreiben den Einsatz einer solchen „On-Column-Silylierung“ zur Bestimmung von Phenolen [HELALEH, 2001].

Die Möglichkeit der Derivatisierung im GC sollte ebenfalls für die Silylierung der Estrogene getestet werden. Die im Folgenden aufgeführten Reagenzien kamen dabei zum Einsatz:

- A) MSTFA
- B) MSTFA mit 10% TMSIM
- C) MSTFA mit 20% TMSIM
- D) MSTFA mit 50% TMSIM
- E) TMSIM
- F) MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4)

Für die Messungen wurde wieder von den SPME-Standardbedingungen ausgegangen. Die Faser wurde nach der Anreicherung im Injektor desorbiert und im Anschluss daran 1 µl des jeweiligen Derivatisierungsreagenzes eingespritzt. Die GC-Temperatur wurde für weitere 5 min bei 100 °C belassen, dann das Splitventil geöffnet und der Temperaturgradient gestartet.

A) MSTFA

Die Umsetzung mit reinem MSTFA lieferte nur für Estron das erwartete E1-TMS-Derivat. Estradiol wies einen zweiten Peak der Masse 344 im Chromatogramm auf, der der einfach silylierten Verbindung entsprach. Die Umsetzung von Ethinylestradiol ergab wieder drei Peaks, die E1-TMS, EE2-TMS(1) und EE2-TMS(2) zuzuordnen waren.

B/C/D) MSTFA mit 10% / 20% / 50% TMSIM

Die Zugabe von 10% TMSIM ermöglichte die vollständige Derivatisierung des Estradiols zu E2-TMS(2). EE2 ergab jedoch auch mit einem TMSIM-Anteil von 50% noch immer einen kleinen Peak für E1-TMS.

E) TMSIM

Selbst durch die Injektion von reinem TMSIM konnte Ethinylestradiol nicht vollständig umgesetzt werden.

F) MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4)

Auch die für die direkte Derivatisierung der Estrogene eingesetzte Reagenzmischung aus MSTFA, DTE und TMSI erbrachte keine Umsetzung des Ethinylestradiols zu einem einheitlichen Produkt. Die Reaktivität dieses Reagenzes war andererseits aber so hoch, dass teilweise wieder die Ketogruppe des Estrons silyliert wurde.

Um durch das direkte Injizieren des Derivatisierungsreagenzes im Anschluss an die Desorption eine vollständige Umsetzung der Estrogene zu erlangen, ist vermutlich eine längere Reaktionszeit erforderlich. Die Säulentemperatur wurde daher für weitere 5 min bei 100 °C belassen, was die Derivatisierung allerdings nicht verbesserte. Das grundlegende Problem bei der Online-Derivatisierung stellte die unterschiedliche Reaktivität der funktionellen Gruppen dar, so dass diese Art der Derivatisierung zwar für einfache Phenole, allerdings nicht für die zu untersuchenden Estrogene geeignet war.

3.6.7 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG AN DER FASER

Zur Aufnahme von Kalibrierkurven wurden Standardlösungen von E1, E2 und EE2 in Aqua bidest. in einem Konzentrationsbereich von 10-100 ppt (10-100 ng/l) hergestellt (7.2). Jede Lösung wurde einmal unter den optimierten SPME-Bedingungen angereichert und im Anschluss daran direkt an der Faser derivatisiert (7.1.2.4). Allen Lösungen wurde Estradiol- d_2 als interner Standard in einer Konzentration von 50 ppt (50 ng/l) zugesetzt. Die Messung der Proben erfolgte am GC/MS im SIM-Modus (7.1.2.6).

Die Abbildung zeigt die Ionenspuren, die zur quantitativen Bestimmung der Estrogene herangezogen wurden.

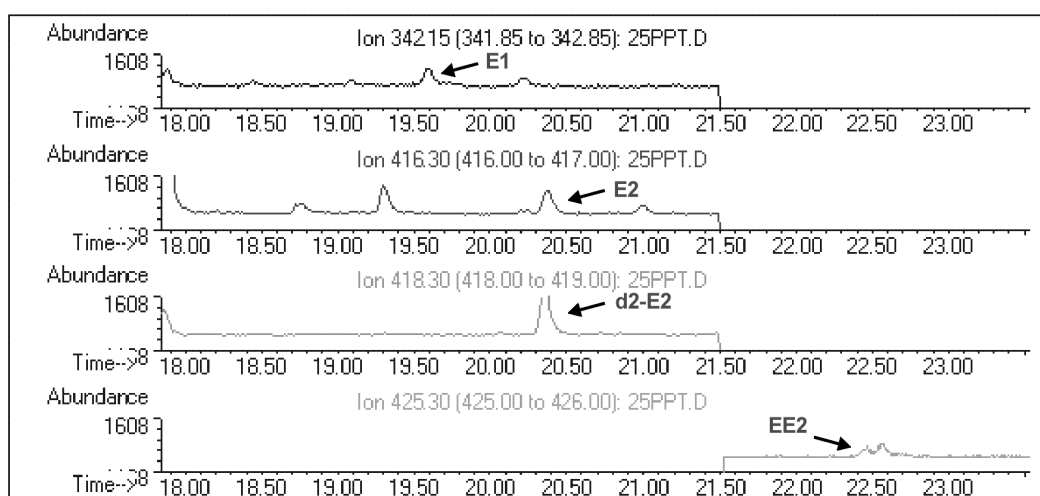


Abbildung 3.41: Ionenspuren der Estrogene (SPME-Deriv-GC/MS)

25ng/l E1/E2/EE2, 50ng/l d_2 -E2

E1-TMS: $m/z=342,15$; E2-TMS(2): $m/z=416,3$; d_2 -E2-TMS(2): $m/z=418,3$; EE2-TMS(2): $m/z=425,3$

Nach Integration der Ionenspuren wurden die Kalibrierkurven 3.42a bis c erhalten. Die zugehörigen Messwerte sind im Anhang 8.1.9 angegeben.

Über das Signal-Rausch-Verhältnis wurde für E2 eine Nachweisgrenze ($S/N=3:1$) von 10 ng/l und für E1 und EE2 jeweils eine NG ($S/N=3:1$) von 25 ng/l ermittelt. Daraus ergaben sich für die quantitative Analytik Bestimmungsgrenzen ($S/N=10:1$) von 30 ng/l für E2 und 75 ng/l für E1 und EE2. Diese Konzentrationen liegen allerdings zu hoch für den Einsatz der Methode zur spurenanalytischen Bestimmung der Estrogene, da die bisher im Abwasser nachgewiesenen Gehalte praktisch nicht über den unteren ppt-Bereich (ng/l) hinausgingen (siehe Tabelle 1.1).

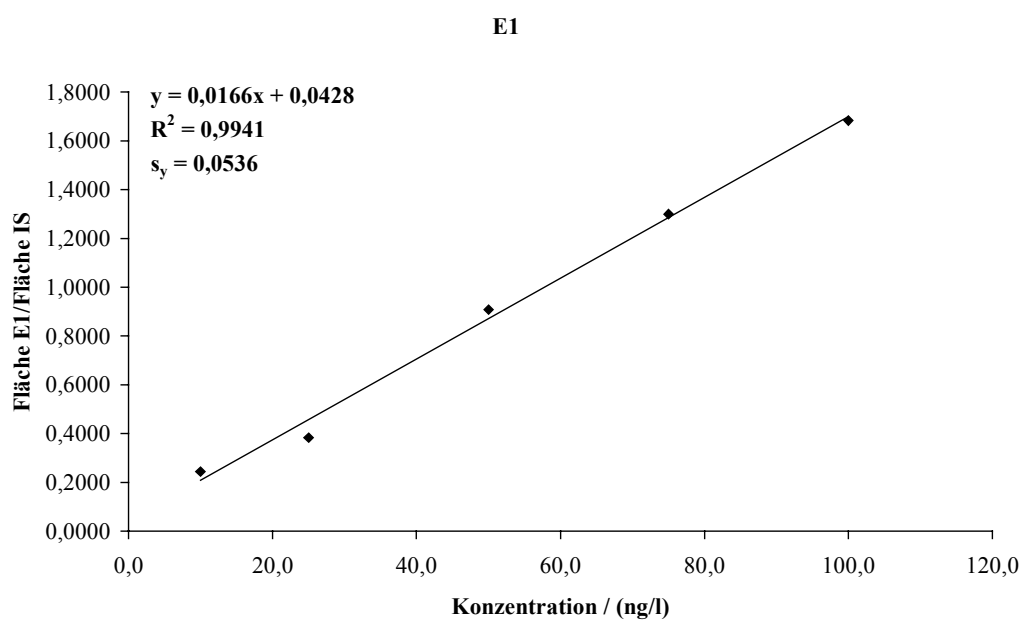


Abbildung 3.42a: Kalibriergerade für **Estron**: 10-100 ng/l (d_2 -E2: 50 ng/l)

Aqua bidest., GC/MS

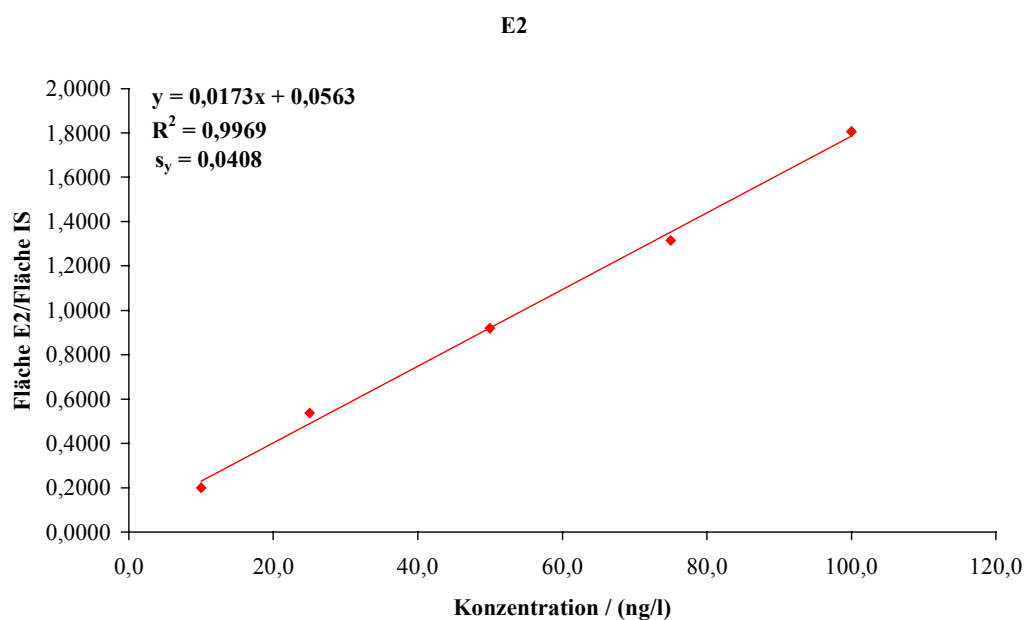


Abbildung 3.42b: Kalibriergerade für **Estradiol**: 10-100 ng/l (d_2 -E2: 50 ng/l)

Aqua bidest., GC/MS

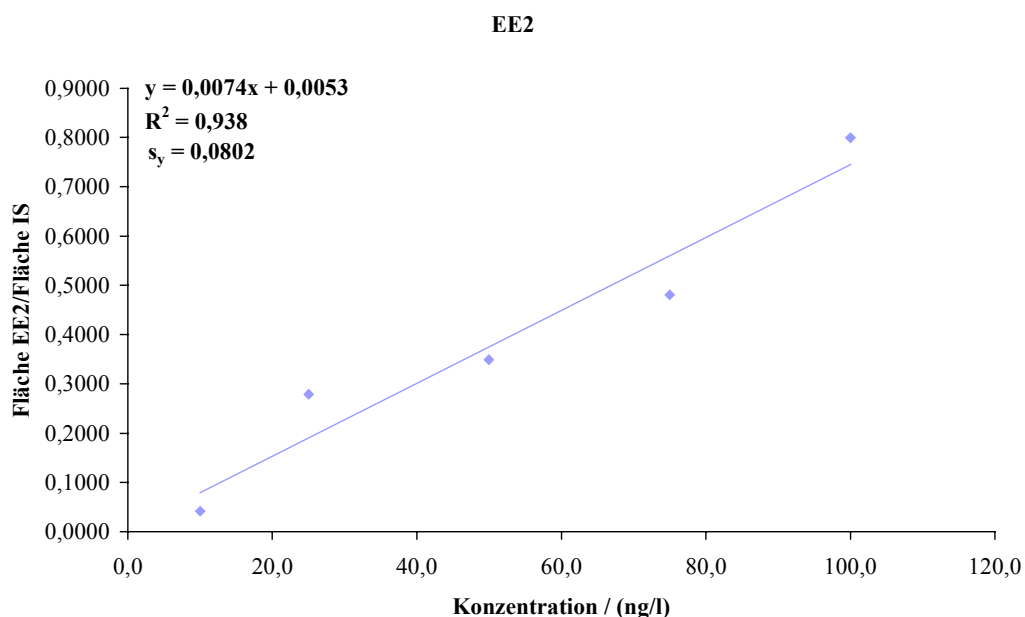


Abbildung 3.42c: Kalibriergerade für **Ethinylestradiol**: 10-100 ng/l (d_2 -E2: 50 ng/l)

Aqua bidest., GC/MS

Um die SPME dennoch für quantitative Bestimmungen bis zu einer Konzentration von 10 ng/l einsetzen zu können, wurden an zwei weiteren Tagen erneut Kalibrierkurven im gleichen Konzentrationsbereich aufgenommen und daraus die Präzision für jede Konzentration ermittelt. Die Variationskoeffizienten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen, die Messwerte finden sich im Anhang 8.1.9.

Tabelle 3.3: Variationskoeffizienten berechnet aus den Flächenquotienten (n=3, *n=2)

	E1/d_2-E2	E2/d_2-E2	EE2/d_2-E2
10 ng/l	40,8%	29,5%	34,8% *
25 ng/l	43,1%	6,1%	32,7%
50 ng/l	10,3%	11,7%	18,3%
75 ng/l	9,8%	8,0%	32,9%
100 ng/l	3,1%	10,4%	19,3%

In einer grundlegenden Arbeit zur Evaluierung analytischer Methoden hat sich Horwitz mit der Präzision quantitativer Bestimmungen auseinandergesetzt [HORWITZ, 1982]. Durch Ringversuche ermittelte er eine empirische Formel, anhand derer die üblicherweise zu erwartende relative Standardabweichung einer Methode in Abhängigkeit der eingesetzten Analytkonzentration abgeschätzt werden kann [KROMIDAS, 2000]. Für eine Pro-

benkonzentration von 1 ppm liegt der zu erwartende Variationskoeffizient unter Wiederholbedingungen bei 11% und für eine Konzentration von 1 ppb bereits bei 30%. Berechnet man anhand dieser Gleichung den Wert für eine Konzentration von 10 ppt (10 ng/l), der niedrigsten Kalibrierkonzentration, so ergibt sich ein Vk von 60%.

Für die Präzision einer spurenanalytischen Methode im ppt-Bereich sollte damit als Kriterium der Bestimmungsgrenze ein Variationskoeffizient von bis zu 50% als ausreichend erachtet werden. Vergleicht man damit die ermittelten Variationskoeffizienten in Tabelle 3.3, so ist die SPME mit Derivatisierung und anschließender GC/MS durchaus für quantitative Bestimmungen bis in den Bereich von 10-100 ng/l einsetzbar. Es muss allerdings angemerkt werden, dass die Präzision hier nur aus drei Messwerten ermittelt wurde, was allerdings aufgrund des relativ großen Zeitaufwandes nicht anders möglich war.

3.6.8 VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN AN SPME-PHASEN (K_{fs})

Im Rahmen der Optimierungsversuche zur SPME fiel auf, dass sich Ethinylestradiol im Anreicherungsverhalten teilweise deutlich von Estron und Estradiol unterscheidet. So ergab die Anreicherung gleicher Konzentrationen stets größere Peakflächen für EE2. Die unterschiedliche Empfindlichkeit konnte nicht in der Detektion begründet sein, da solche Intensitätsunterschiede nach direkter Injektion von Standardlösungen nicht beobachtet wurden. Auch der Vergleich der Kalibrierkurven in Abb. 3.42a-c zeigt das unterschiedliche Verhalten von Ethinylestradiol im Vergleich mit den beiden anderen Estrogenen auf. Die Korrelation der Messwerte für EE2 ist schlechter als die der anderen Estrogene, was darauf hinweist, dass Estradiol- d_2 kein besonders gut geeigneter interner Standard für die EE2-Bestimmung war. Es verhält sich bei der Anreicherung offensichtlich anders.

Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass E1 und E2 ähnliche Verteilungskoeffizienten an Polyacrylat aufweisen, der Verteilungskoeffizient des Ethinylestradiols allerdings davon verschieden sein müsste.

3.6.8.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Um die K_{fs} -Werte der Estrogene zu bestimmen, wurden diese aus einer 50 ppb-Lösung bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes angereichert (siehe Arbeitsvorschrift 7.2). Die mit der Faser extrahierte Stoffmenge wurde über eine externe Kalibrierung durch direkte Injektion von Standardlösungen ermittelt. Alle Messungen wurden manuell und ohne Zusatz eines internen Standards am GC/FID durchgeführt. Da 1 µl Lösung ohne internen Standards nur schwer reproduzierbar zu injizieren ist, wurde zunächst die Präzision der Kalibrierung überprüft. An vier verschiedenen Tagen wurden Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich von 0,025-0,3 µg/µl aufgenommen. In der folgenden Graphik sind

am Beispiel des Estrons die an den vier Tagen erhaltenen Messwerte zu einer Kurve zusammengefasst. Eine Wertetabelle mit allen Messwerten findet sich im Anhang (8.1.10). Ebenfalls angegeben sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sowie der lineare Ausgleich.

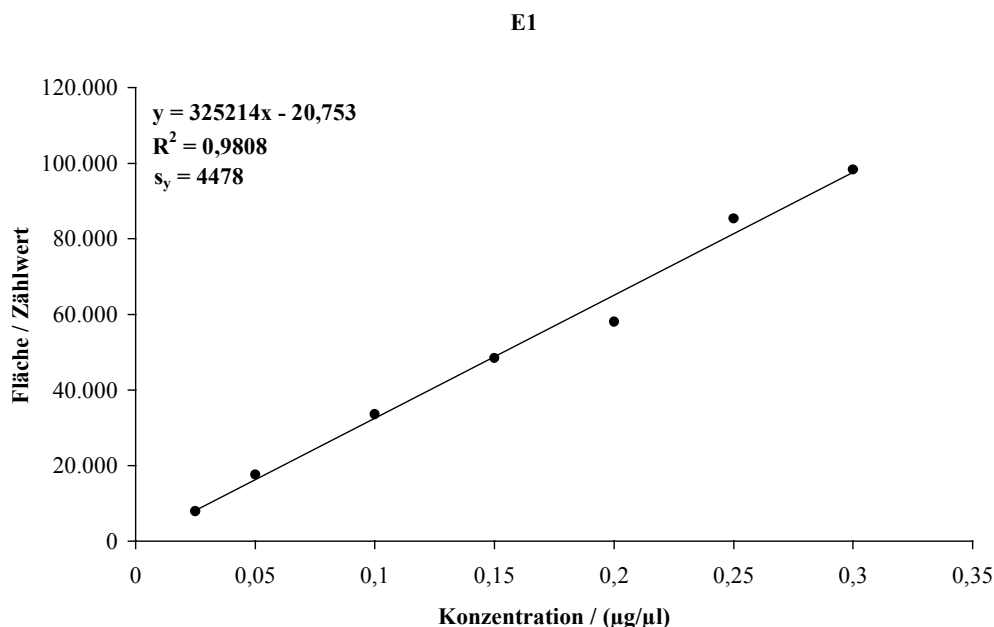


Abbildung 3.43: Kalibriergerade für **Estron**: 0,025-0,3 µg/µl, 1 µl, n=4, **GC/FID**

Die Präzision der Kalibrierungen ist mit Variationskoeffizienten im Bereich von 4-10% für eine manuelle GC-Injektion ohne Zugabe eines internen Standard sehr gut. Nur für die niedrigste Konzentration wurden Variationskoeffizienten größer 10% erhalten (E1: $V_k=11,0\%$, E2: $V_k=12,5\%$, EE2: $V_k=13,0\%$). Die so ermittelten Kalibrierkurven wurden im Folgenden zur Berechnung der angereicherten Massen eingesetzt. Die Richtigkeit der Kalibrierungen wurde täglich durch einzelne Standardmessungen überprüft.

Die Berechnung der Verteilungskoeffizienten erfolgte anhand der folgenden Gleichung:

$$K_{fs} = \frac{c_f}{c_s} = \frac{n_f V_s}{V_f (c_o V_s - n_f)} \quad (10)$$

K_{fs} : Verteilungskoeffizient Faser/Lösung, c_f : Konzentration in der Faser, c_s : Konzentration in der Lösung, n_f : von der Faser angereicherte Stoffmenge, V_s : Volumen der Lösung, V_f : Volumen der Faser, c_o : Ausgangskonzentration des Analyten in der wässrigen Probenlösung

Für die Bestimmung der K_{fs} -Werte musste noch der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung ermittelt werden. Die Versuche zur Optimierung der SPME-Bedingungen

hatten gezeigt, dass nach 4 h die Anreicherung noch nicht im Gleichgewicht war (siehe 3.6.2.3). Da der exakte Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung eigentlich nicht entscheidend ist, wurde aus praktikablen Gründen die Anreicherungszeit direkt auf 22 h gesetzt. Die Probe konnte so über Nacht angereichert und am nächsten Tag direkt vermessen werden. Um zu belegen, dass die 22 h zum Erreichen des Gleichgewichtes ausreichend sind, wurde eine weitere Anreicherung über einen deutlich längeren Zeitraum von 63 h durchgeführt. Es wurden die folgenden Peakflächen erhalten, die belegen, dass nach 22 h praktisch keine Peakflächenzunahme mehr erfolgte.

	E1	E2	EE2
Anreicherungszeit	Peakfläche	Peakfläche	Peakfläche
22 h	20.063	17.999	63.326
63 h	20.147	17.810	63.209

Eine wichtige Voraussetzung zur Bestimmung korrekter K_{fs} -Werte besteht darin, dass eine Sättigung der Faser während der Anreicherung ausgeschlossen werden muss. Um dies zu überprüfen wurde eine zehnfach höher konzentrierte Lösung (500 ppb) ebenfalls für 22 h angereichert. Die erhaltenen Peakflächen lagen wie erwartet ca. um den Faktor 10 höher, so dass es bei Anreicherung einer 50 ppb-Lösung sicher zu keiner Sättigung der Faser kommt.

Obwohl die Größe des Verteilungskoeffizienten bei Anreicherung verdünnter Lösungen unabhängig vom Volumen sein sollte, wurde die Bestimmung aus verschiedenen Volumina durchgeführt. Es sollte dadurch möglich sein, Wandeffekte bei der Anreicherung kleiner Volumina zu erkennen.

Die Anreicherungen erfolgten unter Einsatz von zwei verschiedenen Polyacrylat-Fasern, die im Folgenden mit Faser A und B bezeichnet werden. Faser A war hierbei eine neue Polyacrylat-Faser, die zuvor noch nie zu Anreicherungen verwendet wurde, wohingegen Faser B bereits einige Male vorher benutzt wurde.

Die ermittelten Verteilungskoeffizienten wurden in der folgenden Tabelle 3.4 einander gegenübergestellt. Eine ausführliche Tabelle zur Berechnung der K_{fs} -Werte ist im Anhang angegeben (Tab. 8.23).

Tabelle 3.4: Experimentell ermittelte Verteilungskoeffizienten (K_{fs} -Werte)

Faser A: neue PA-Faser; Faser B: PA-Faser, die bereits einige Male benutzt wurde

Für die grau hinterlegten (leeren) Felder wurden keine Messwerte ermittelt.

V [ml]	E1		E2		EE2	
	K_{fs} (A)	K_{fs} (B)	K_{fs} (A)	K_{fs} (B)	K_{fs} (A)	K_{fs} (B)
1,5	45.542		17.024			
3	11.239	3.068	8.749	3.080	148.895	7.693
5	9.169	3.071	7.226	3.360	33.649	9.036
10	8.129	3.188	7.439	3.233	39.375	9.907
20	7.610	3.012	6.952	3.237	29.258	7.033
50	6.911	3.368	6.420	3.238	21.815	7.621
100		3.269		3.328		8.002

Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass die Verteilungskoeffizienten von E1 und E2 in etwa der gleichen Größenordnung liegen, wohingegen der K_{fs} -Wert von EE2 deutlich größer ist. Dies erklärt, warum das als interner Standard eingesetzte deuterierte Estradiol sich sehr gut für die Bestimmung von E2 und E1, jedoch weniger gut für die Bestimmung von EE2 eignet.

Der Vergleich der Messungen an Faser A und B zeigt aber einen weiteren Unterschied auf. Das Ausmaß der Anreicherung und damit die Größe des Verteilungskoeffizienten scheint ganz entscheidend von der gerade verwendeten Faser, d.h. deren Alter und Beschaffenheit abzuhängen. Die Anreicherungen an der neuen Faser A ergaben deutlich größere Peakflächen und damit in der Berechnung auch höhere K_{fs} -Werte. Verwunderlich ist in diesem Zusammenhang die Veränderung der Verteilungskoeffizienten in Abhängigkeit des Analysenvolumens, da die K_{fs} -Werte eigentlich volumenunabhängig sein sollten. Bei Anreicherung aus kleinen Volumina ergaben sich deutlich höhere Verteilungskoeffizienten als bei Anreicherung aus großen Volumina. Dies steht im Gegensatz zu eventuell erwarteten Wandeffekten. Beim Auftreten von Wandeffekten käme es bei kleineren Volumina durch Adsorption an den Gefäßwänden zu einer verminderten Anreicherung und damit zu niedrigeren K_{fs} -Werten.

Die Beobachtungen lassen sich nicht durch ein reines Verteilungsmodell erklären, es scheint sich bei der Anreicherung vielmehr um eine Kombination aus Verteilung und Adsorption zu handeln. Eine neue Polyacrylatfaser weist an ihrer Oberfläche eventuell aktive Stellen auf, an denen Moleküle auch adsorbieren können. Werden diese aktiven Stellen im Laufe der Verwendung der Faser „verbraucht“, so folgt die Anreicherung schließlich einer reinen Nernst-Verteilung.

3.6.8.2 Anpassung eines Anreicherungsmodells am Beispiel von Estron

Für Estron wurde anhand der an Faser A und B erhaltenen Messwerte eine entsprechende Modellierung versucht. Zur Beschreibung der Adsorption wurde die Langmuir-Isotherme herangezogen. Die angereicherten Stoffmengen in Abhängigkeit des eingesetzten Analysenvolumens V_s lassen sich für die verschiedenen Anreicherungsmechanismen aus den folgenden Gleichungen berechnen:

1.) Nernst-Verteilung:

$$K_{fs} = \frac{c_f}{c_s} = \frac{(n_f / V_f)}{c_o - (n_f / V_s)} \quad (11)$$

K_{fs} : Verteilungskoeffizient Faser/Lösung, c_s : Konzentration in der Lösung, c_f : Konzentration in der Faser, V_f : Volumen der Faser, V_s : Volumen der Lösung, n_f : an der Faser angereicherte Stoffmenge, c_o : Ausgangskonzentration des Analyten in der Lösung

Daraus ergibt sich die durch Verteilung angereicherte Stoffmenge n_{ver} zu:

$$n_{ver} = \frac{K_{fs} V_f V_s c_o}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (12)$$

n_{ver} : durch Verteilung an der Faser angereicherte Stoffmenge ($\equiv n_f$)

2.) Langmuir-Adsorption:

$$n_{ads} = \frac{n_{max} K_a c_s}{1 + K_a c_s} \quad (13)$$

n_{ads} : durch Adsorption angereicherte Stoffmenge, n_{max} : maximal adsorbierbare Stoffmenge, K_a : Adsorptionskoeffizient

Mit $c_s = \frac{n_o - n_{ads}}{V_s}$ und $n_o = c_o V_s$

(n_o : Ausgangsstoffmenge des Analyten in der Lösung)

erhält man für die adsorbierte Stoffmenge n_{ads} :

$$n_{ads} = \frac{1}{2} \left(n_{max} + c_o V_s + \frac{V_s}{K_a} - \sqrt{\left(n_{max} + V_s \left(c_o + \frac{1}{K_a} \right) \right)^2 - 4 c_o V_s n_{max}} \right) \quad (14)$$

3.) Kombination aus Nernst-Verteilung und Langmuir-Adsorption:

Hier entspricht die von der Faser extrahierte Stoffmenge n_{ex} der Summe aus Nernst-Verteilung und Langmuir-Adsorption:

$$n_{\text{ex}} = n_{\text{ver}} + n_{\text{ads}} \quad (15)$$

n_{ex} : von der Faser durch Verteilung und Adsorption extrahierte Stoffmenge

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Gleichung mit den eingesetzten Größen verzichtet.

Die Berechnungen für Estron erfolgten ausgehend von den an der Faser B ermittelten Verteilungskoeffizienten. Aus diesen wurde der Mittelwert berechnet ($K_{\text{fs}}=3.163$). Ob dieser Wert tatsächlich einem reinen Verteilungskoeffizienten entspricht, ist nicht bekannt, er stellt allerdings einen guten Ausgangswert für die Berechnungen dar. Da die Größen des Adsorptionskoeffizienten K_a und der maximal adsorbierbaren Stoffmenge n_{max} experimentell nicht zugänglich waren, wurden entsprechende Werte durch Einsetzen in die Gleichungen und Anpassen ermittelt.

Mit $K_{\text{fs}}=3.163$, $K_a=500$ und $n_{\text{max}}=0,3$ nmol ergeben sich für die drei betrachteten Anreicherungsmodelle folgende Kurven. An den Achsen ist der prozentual extrahierte Stoffmengenanteil gegen das vorgelegte Analysenvolumen abgetragen.

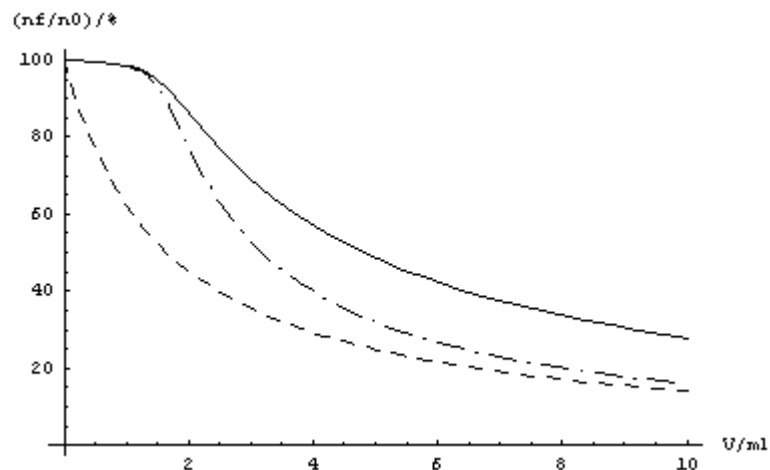


Abbildung 3.44: Vergleich der Anreicherungsmodelle: Verteilung (---), Adsorption (- · -), Kombination aus Verteilung und Adsorption (—)

E1: 50ppb, n_f/n_0 =an der Faser angereicherte Stoffmenge bezogen auf die Gesamtstoffmenge

K_{fs} : 3.163 (experimentell), K_a : 500 (aus Anpassung), n_{max} : 0,3nmol (aus Anpassung),

V_f : 0,000521ml (SCHEPPERS WERCINSKI, 1999), c_0 : 0,184911nmol/ml, V_s : variabel

Die für die verschiedenen Anreicherungsvolumina von 1,5-100 ml nach allen drei Modellen berechneten zugehörigen Stoffmengenanteile sind in der folgenden Tabelle den an der Faser A und B experimentell ermittelten Stoffmengenanteilen gegenübergestellt.

Tabelle 3.5: Angereicherter Stoffmengenanteil n_f/n_o des Estrons– experimentell ermittelt und theoretisch berechnet

Berechnung mit K_{fs} : 3.163 (aus experimentellen Werten), K_a : 500 (aus Anpassung), n_{max} : 0,3 nmol (aus Anpassung), V_f : 0,000521 ml (SCHEPPERS WERCINSKI, 1999) und c_o : 0,184911 nmol/ml
Für die grau hinterlegten (leeren) Felder wurden keine Messwerte ermittelt.

V_s [ml]	EXPERIMENTELL		BERECHNET		
	Faser A	Faser B	Verteilung	Adsorption	Verteilung + Adsorption
1,5	94,1%		52,3%	93,2%	94,9%
3	66,1%	34,8%	35,5%	52,9%	69,2%
5	48,9%	24,2%	24,8%	31,9%	48,7%
10	29,8%	14,2%	14,1%	16,0%	27,9%
20	16,5%	7,3%	7,6%	8,0%	15,0%
50	6,7%	3,4%	3,2%	3,2%	6,3%
100		1,7%	1,6%	1,6%	3,2%

Die an Faser B ermittelten Werte stimmen mit einem Verteilungsmodell überein, wohingegen die Werte an der neuen Faser A einem kombinierten Verteilungs-Adsorptions-Modell sehr nahe kommen.

Das hier dargestellte Ergebnis soll kein Beweis für die Richtigkeit des zugrunde gelegten Modells sein, vor allem nicht, da die Größe des Adsorptionskoeffizienten K_a und der maximal adsorbierbaren Stoffmenge n_{max} , die für die Berechnung benötigt wurden, allein durch Anpassung ermittelt wurden. Es soll aber einen Hinweis darauf geben, dass die Anreicherung der Estrogene an einer Polyacrylat-Faser wahrscheinlich nicht allein durch einen Verteilungsvorgang erklärt werden kann – zumindest nicht, wenn eine neue Faser zur Anreicherung verwendet wird. Für die Spurenanalytik der Estrogene hätten solche zusätzlichen adsorptiven Wechselwirkungen den Vorteil einer höheren Anreicherungskapazität und damit einer effektiveren Aufkonzentrierung. Von Nachteil ist jedoch, dass sich das Anreicherungsverhalten der Faser offensichtlich im Laufe der Zeit ändert. Außerdem spielt bei der Adsorption im Gegensatz zur Verteilung auch die Konkurrenz und Wechselwirkung mit anderen Proben- und Matrixbestandteilen eine größere Rolle, so dass mit einer stärkeren Beeinflussung der Anreicherung zu rechnen ist [GORECKI, 1999]. Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten mittels SPME wird auch in der Literatur beschrieben. Verschiedene Autoren nutzen die an SPME-Phasen ermittelten K_{fs} -Werte

zur Vorhersage von Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}) [DOONG, 2000], [DEAN, 1996], [YANG, 1998]. Oftmals ist allerdings die direkte Korrelation mit K_{ow} -Werten nicht gegeben, da es sich bei den verwendeten SPME-Phasen eben nicht um Octanol sondern um Polydimethylsiloxan oder Polyacrylat handelt. Sinnvoller als die direkte Bestimmung von Verteilungskoeffizienten mittels SPME erscheint der Einsatz der Methode zur Quantifizierung der Analyte in der wässrigen Phase bei einem Verteilungsvorgang [PASCHKE, 1998]. Da SPME-Messungen direkt aus der wässrigen Phase ohne vorherigen Probenvorbereitungsschritt erfolgen können, ist es auch möglich, Sorptionsvorgänge an im Wasser gelösten organischen Substanzen, wie z.B. Huminstoffen, kinetisch zu verfolgen [POERSCHMANN, 1997], [OHLENBUSCH, 2000].

Für die Praxis der SPME ist die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten eine wichtige Methode zur Auswahl eines internen Standards, gerade wenn isotopenmarkierte Analoga nicht zur Verfügung stehen bzw. diese zu teuer sind. Das Beispiel von Estradiol und Ethinylestradiol hat gezeigt, dass sich auch strukturell sehr ähnliche Verbindungen in ihrem Anreicherungsverhalten stark unterscheiden können. Da für die eigenen Untersuchungen jedoch kein besser geeigneter interner Standard als das deuterierte Estradiol zur Verfügung stand, wurden alle quantitativen SPME-Bestimmungen mit diesem durchgeführt.

4 VERGLEICH UND DISKUSSION DER ENTWICKELTEN ANALYSEVERFAHREN

Die Eignung der Verfahren zur spurenanalytischen Bestimmung der Estrogene im Abwasser wurde anhand folgender Kriterien beurteilt:

A) Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze der Methode muss so niedrig liegen, dass Messungen im unteren ng/l-Bereich realisierbar sind, da die bisher im Abwasser detektierten Estrogenkonzentrationen praktisch nicht über den ng/l-Bereich hinaus gingen (siehe Tab. 1.1).

B) Selektivität

Die Methode sollte eine möglichst hohe Selektivität aufweisen, da auch gereinigtes Abwasser noch eine äußerst komplexe Matrix darstellt, in der neben den Estrogenen eine große Zahl anderer Verbindungen anzutreffen sind. Um richtige Ergebnisse zu erhalten, ist eine Differenzierung zwischen Analyt und möglichem Begleitstoff unumgänglich.

C) Präzision

Bei der Beurteilung der Präzision einer Methode muss berücksichtigt werden, dass diese sowohl von der Zahl der Analyseschritte als auch von der Probenmatrix und Probenkonzentration abhängt. Im Gegensatz zur Pharmaindustrie, wo in der Qualitätskontrolle z.B. Variationskoeffizienten von 1-2% erreicht werden, trifft man bei umweltanalytischen Bestimmungen auf Variationskoeffizienten im Bereich von 10-15% bzw. bei spurenanalytischen Fragestellungen auch weit darüber [HORWITZ, 1982].

In der Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite sind die im Rahmen der Arbeit getesteten Analysemethoden einander gegenübergestellt.

Tabelle 4.1: Vergleich der Analyseverfahren zur Spurenanalytik der Estrogene

Methoden	Bestimmungsgrenze	Selektivität	Präzision
LLE-HPLC/ELCD	nicht ermittelt wegen unzureichender Selektivität, Bestimmung von E3 nicht möglich	unzureichende Matrixabtrennung, schlechte Trennleistung, Detektion wenig selektiv	bei manueller Durchführung ohne IS schlecht reproduzierbar
LLE-GC/MS (mit Derivatisierung)	nicht ermittelt wegen unzureichender Matrixabtrennung, Bestimmung von E3 möglich	unzureichende Matrixabtrennung, bessere Trennleistung als HPLC, selektivere Detektion als ELCD, dennoch falsch positive Ergebnisse nicht auszuschließen (Bsp. Lignocerinsäure!)	nicht ermittelt (d_2 -E2 als IS einsetzbar)
SPE-HPLC/ELCD	> 100 ng/l, Bestimmung von E3 u.U. möglich	bessere Matrixabtrennung als LLE, schlechte Trennleistung, Detektion wenig selektiv	Präzision besser als LLE, ohne IS jedoch schlecht reproduzierbar
SPE-GC/MS (ohne Waschschrift H ₂ O/MeOH (6:4), mit Derivatisierung)	E1: 1 ng/l E2: 0,5 ng/l EE2: 1 ng/l E3: 2 ng/l (S/N=10:1)	bessere Matrixabtrennung als LLE, bessere Trennleistung als HPLC, selektivere Detektion als ELCD, dennoch falsch positive Ergebnisse nicht auszuschließen (Bsp. Lignocerinsäure!)	E1: Vk 5,7% E2: Vk 2,4% EE2: Vk 14,4% E3: Vk 20,4% 10 ng/l (IS: 10 ng/l d_2 -E2) (n=3)
SPME-GC/MS (mit Derivatisierung)	E1: 10 ng/l E2: 10 ng/l EE2: 10 ng/l E3: nicht bestimmbar (Vk < 50%)	bessere Matrixabtrennung als SPE, trotz guter Trennleistung und selektiver Detektion falsch positive Ergebnisse nicht auszuschließen (Bsp. Lignocerinsäure!)	E1: Vk 40,8% E2: Vk 29,5% EE2: Vk 34,8%* 10 ng/l (IS: 50 ng/l d_2 -E2) (n=3/*2)

Anhand der geforderten Kriterien erfolgt die Beurteilung der Verfahren. Zusätzlich werden Möglichkeiten zur Verbesserung der Methoden aufgezeigt.

⇒ Bestimmungsgrenze

Die geforderten Bestimmungsgrenzen im unteren ng/l-Bereich (ppt-Bereich) konnten nur mittels SPE-GC/MS und SPME-GC/MS erreicht werden. Für beide Methoden ist der Spielraum zwischen Bestimmungsgrenze und zu erwartender Umweltkonzentration jedoch sehr klein, so dass die Leistungsfähigkeit der Methoden bei Messungen von Realproben praktisch vollständig ausgeschöpft werden muss. Die für die SPE-

GC/MS über das Signal-Rausch-Verhältnis ($S/N=10:1$) ermittelten Bestimmungsgrenzen liegen bei 0,5-2 ng/l. Bei der SPME-GC/MS sind Messungen bis zu einer Konzentration von 10 ng/l möglich, allerdings nur unter der Bedingung, dass die dabei erzielte Präzision von 30-40% relativer Standardabweichung als ausreichend erachtet wird.

Als Möglichkeiten zur Verbesserung der Bestimmungsgrenzen für weiterführende Arbeiten sind neben der Aufarbeitung größerer Probenvolumina bei der SPE auch eine effektivere Ausreizung der SPME-Variablen sowie vor allem gerätetechnische Veränderungen zu nennen. So könnten z.B. mit einem moderneren GC/MS oder GC/MS/MS Bestimmungsgrenzen erreicht werden, die mindestens um den Faktor 10 niedriger liegen als die hier erzielten.

Allein aus Sicht der analytischen Bestimmungsmethode wäre auch die HPLC/ELCD für Messungen im ng/l-Bereich einsetzbar, problematisch war hier jedoch die mangelnde Selektivität der Methode.

⇒ Selektivität

Für spurenanalytische Bestimmungen aus komplexen Probenmatrices kann die Selektivität der Methode bzw. der einzelnen Analyseschritte praktisch nicht hoch genug sein. Wie das Beispiel der Lignocerinsäure gezeigt hat, sind auch bei Einsatz der MS in Kombination mit einer leistungsfähigen Kapillar-GC-Methode falsch positive Ergebnisse nicht vollkommen auszuschließen. Wesentlich schwerwiegender war das Problem der mangelnden Selektivität allerdings bei der HPLC/ELCD, mit der eine Bestimmung der Estrogene aus Abwasser nicht möglich war.

Als möglicher Ansatzpunkt zur Steigerung der Selektivität ist zunächst eine spezifischere Probenvorbereitung denkbar. Störkomponenten werden so vor der Bestimmung sicher abgetrennt bzw. gar nicht erst mit angereichert. Mittels LLE ist eine solche Selektivitätserhöhung kaum zu realisieren. Für die SPE könnten aber u.U. spezifischere Sorbentien eingesetzt werden, deren Anreicherungsmechanismus auf anderen Prinzipien, wie z.B. Größenausschluss oder einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht. Für die Festphasenmikroextraktion wurden bereits sehr selektive Anreicherungen von Theophyllin mittels Immunoaffinitäts-SPME beschrieben [YUAN, 2001]. Der Trend in der Analytik geht jedoch allgemein dahin, die Probenvorbereitung sehr einfach zu halten, und dafür eine möglichst selektive Bestimmungsmethode einzusetzen. Dies führt zu einer drastischen Verringerung des Zeitbedarfes und ermöglicht damit einen höheren Probendurchsatz. Eine Möglichkeit zur Selektivitätsverbesserung

rung der analytischen Methode bestünde im Einsatz eines leistungsfähigeren Trennverfahrens. Mit der Mikro-LC (Kapillar-LC) werden deutlich höhere Trennleistungen und bessere Auflösungen als mit der konventionellen HPLC erzielt, es könnte aber auch eine Trennung mittels Kapillarelektrophorese versucht werden. Als dritter Punkt könnte schließlich noch die Selektivität der Detektion gesteigert werden. Zu nennen wäre z.B. eine Messung mittels MS/MS. Durch die Selektion von Mutterionen und deren erneute Fragmentierung kann eine Verbindung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit richtig identifiziert werden, so dass falsch positive Ergebnisse praktisch ausgeschlossen werden können. Als weitere Variante wäre auch die Verwendung einer biochemischen Detektion zu nennen. Oosterkamp et al. konnten mittels LC-RAD (receptor affinity detection) Estradiol in einer Konzentration von 100 pmol/l (~27 ng/l) aus Umweltproben bestimmen [OOSTERKAMP, 1997]. Zhihong et al. führten Untersuchungen zur Estrogenbestimmung mit einem piezoelektrischen Biosensor im Anschluss an eine Fließinjektionsanalyse (FIA) durch [ZHIHONG, 1999].

⇒ Präzision

Die Präzision der SPE-GC/MS mit Variationskoeffizienten im Bereich von 2,4% bis 20,4% lag ebenso wie die der SPME-GC/MS mit Variationskoeffizienten zwischen 29,5% und 40,8% im erwarteten Rahmen.

Eine Verbesserung der Präzision wäre durch eine Automatisierung der Analysenabläufe zu erzielen. Bei Einsatz einer automatischen Einheit für die Festphasenextraktion oder eines Autosamplers für die SPME könnten Fehler und Abweichungen, die bei manueller Durchführung der Probenvorbereitung unweigerlich auftreten, weitestgehend ausgeschaltet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Präzision bestünde auch in der Zugabe mehrerer interner Standards. Da Fehler, die im Verlauf der Probenvorbereitung und Analyse auftreten, nur durch Verbindungen, die sich genauso wie die Analyten verhalten, korrigiert werden können, sollte im Idealfall für jede Verbindung ein entsprechender interner Standard bzw. Surrogat-Standard der Probe zugesetzt werden.

FAZIT: Zur spurenanalytischen Bestimmung der Estrogene im Abwasser eignet sich von den getesteten Verfahren nur die GC/MS in Kombination mit einer Probenvorbereitung durch SPE oder SPME.

5 ANWENDUNG DER METHODEN AUF DIE MESSUNG VON REALPROBEN

Die Eignung der SPE-GC/MS und SPME-GC/MS zur Spurenanalytik der Estrogene sollte abschließend anhand vergleichender Messungen von Realproben bestätigt werden. Dafür wurden an drei verschiedenen Tagen (10.02.02, 02.03.02 und 06.03.02) Abwasserproben des Klärwerkablaufes in Falkenberg (Berliner Wasserbetriebe) entnommen. Die Probennahme erfolgte durch die Berliner Wasserbetriebe mit einem automatischen Probennehmer. Über 24 Stunden wurden 4h-Mischproben gesammelt, die anschließend im Labor für die Untersuchungen zu einer 24h-Mischprobe gepoolt wurden. Die Abwasserproben sollten sowohl mittels SPE als auch mittels SPME angereichert und anschließend am GC/MS im SIM-Modus analysiert werden. Die Messung aller SPE-Proben sollte ebenso wie die der SPME-Proben an einem Analysentag mit einer Kalibrierkurve erfolgen, um den großen Zeitaufwand durch die Kalibrierungen möglichst zu minimieren. Die Aufarbeitung durch SPE erfolgte jeweils am Tag nach der Probennahme. Nach Elution, Aufreinigung und Abrotieren wurden die Proben bis zum Analysentag im Kühlschrank aufgehoben. Für die SPME-Messungen wurde entsprechend das Abwasser bis zum Analysentag im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung aller SPME-Proben erfolgte am 07.03.02, die der SPE-Proben am 08.03.02. Es wurde dabei vorausgesetzt, dass die Proben über den Lagerungszeitraum stabil waren, da optisch keine Veränderungen beobachtet werden konnten. Eine Überprüfung der Stabilität wäre über die Zielstellung der Arbeit hinausgegangen, sollte jedoch in weitergehende Untersuchungen einbezogen werden.

5.1 SPE-GC/MS

Die Kalibrierung erfolgte über das Gesamtverfahren unter Zugabe des internen Standards Estradiol- d_2 . Die Kalibrierlösungen wurden in Aqua Bidest. hergestellt und enthielten die Estrogene in einem Konzentrationsbereich von 1-50 ng/l. Die Konzentration des internen Standards betrug jeweils 10 ng/l (siehe 7.2). Die Festphasenextraktion erfolgte gemäß des Ablaufschemas in Abb. 3.22 unter Weglassen des Waschschrilles mit $H_2O/MeOH$ (6:4). Nach Derivatisierung mit MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) wurden 2 μ l dieser Lösung in den GC injiziert. Die Kalibrierung wurde als Einfachbestimmung durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Abwasserproben erfolgte nach Zusatz von 10 ng/l d_2 -E2 in der gleichen Weise. Vom Abwasser wurden jeweils zwei Proben angereichert. Eine dritte Probe wurde zusätzlich mit Estrogenen dotiert, um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen.

5.2 SPME-GC/MS

Die Kalibrierung wurde auch hier über das Gesamtverfahren unter Zusatz des internen Standards Estradiol- d_2 durchgeführt. Die Kalibrierlösungen wurden in Aqua Bidest. in einem Konzentrationsbereich von 10-100 ng/l hergestellt. Estriol konnte nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Der interne Standard wurde allen Lösungen in einer Konzentration von 50 ng/l zugesetzt. Nach Anreicherung unter den optimierten SPME-Bedingungen erfolgte die Derivatisierung der Estrogene an der Faser (7.1.2.4).

Die Anreicherung der Abwasserproben erfolgte nach Zugabe von 50 ng/l des internen Standards auf gleiche Art und Weise. Auch hier wurde eine Abwasserprobe zusätzlich mit Estrogenen dotiert, um die Richtigkeit der Analysenmethode zu überprüfen.

Alle Standards und Proben wurden einmal angereichert und vermessen.

5.3 ERGEBNISSE

Von den vier (bzw. bei der SPME nur drei) untersuchten Estrogenen konnte in den Abwasserproben nur Estron detektiert werden. Eine Quantifizierung war sowohl nach SPE- als auch nach SPME-Anreicherung möglich. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Analysenergebnisse für die drei Beprobungstage in einer Gegenüberstellung.

Die Aufstockung der Proben lieferte ein Ergebnis im Rahmen des experimentellen Fehlers, so dass ein proportionaler Fehler ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 5.1: Konzentration von E1 in den Abwasserproben

Estron	10.02.2002	02.03.2002	06.03.2002
SPE-GC/MS	14,8 ng/l	20,5 ng/l	20,6 ng/l
	15,9 ng/l	20,2 ng/l	22,0 ng/l
SPME-GC/MS	9,6 ng/l	17,4 ng/l	13,9 ng/l

Die im Abwasser detektierten Estrongehalte liegen mit rund 10-20 ng/l in der Größenordnung publizierter Literaturwerte und scheinen daher plausibel [KUCH, 2000], [SPENGLER, 1999]. Dass nur Estron in den Proben nachgewiesen wurde, kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass Estron neben 2-Hydroxyestron der Hauptmetabolit der Biotransformation beim Menschen ist [FOTSIS, 1980], [FOTSIS, 1987].

Ethinylestradiol konnte im Gegensatz zu anderen Publikationen nicht nachgewiesen werden. Bei den bisher veröffentlichten Ethinylestradiol-Konzentrationen könnte es sich allerdings teilweise auch um falsch positive Ergebnisse gehandelt haben (siehe Kap. 3.4.3, Coelution von Lignocerinsäure).

Vergleicht man die Messergebnisse untereinander, so stimmen die Werte der SPE-Doppelbestimmung für den jeweiligen Proben tag gut überein, was für die Präzision der Methode spricht. Dass die mittels SPME-GC/MS ermittelten Werte durchweg etwas niedriger als die SPE-GC/MS-Werte liegen, kann im Bereich des Analysenfehlers liegen.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel der Arbeit war es, alternative Methoden zur standardmäßig eingesetzten SPE-GC/MS für die spurenanalytische Bestimmung von Estrogenen im Abwasser aufzuzeigen.

Als Probenvorbereitungstechniken kamen die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Kap. 3.4), Festphasenextraktion (Kap. 3.5) und Festphasenmikroextraktion (Kap. 3.6) zum Einsatz. Zur quantitativen Bestimmung der Proben wurden die Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion und Massenspektrometrie (Kap. 3.3) sowie die HPLC mit UV- und elektrochemischer Detektion (Kap. 3.2) verwendet. Die Anreicherungs- und Analysenbedingungen wurden entsprechend optimiert, um die Bestimmung der vier Estrogene Estron, Estradiol, Estriol und Ethinylestradiol in einer Konzentration von wenigen ng/l aus Abwasser zu ermöglichen. Zusätzlich wurde der Einsatz einer elektrochemischen Screening-Methode erprobt (Kap. 3.1).

Die Beurteilung der entwickelten Methoden erfolgte vorrangig anhand der Kriterien Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Selektivität und Präzision (Kap. 4). Die Eignung der Verfahren wurde abschließend durch die Messung von realen Abwasserproben überprüft (Kap. 5).

- Von den im Rahmen der Arbeit getesteten Analysemethoden konnte mittels SPE-GC/MS und SPME-GC/MS die zur Bestimmung der Estrogene im ppt-Bereich (ng/l) erforderliche Bestimmungsgrenze und Selektivität erreicht werden. Die Bestimmungsgrenzen lagen für die SPE-GC/MS bei 0,5-2 ng/l und für die SPME-GC/MS bei 10 ng/l.

Nach der Messung von Standardlösungen schien auch die HPLC/ELCD eine potente Methode für Messungen im Spurenbereich zu sein. Dies konnte jedoch auf die Analytik der Realproben aufgrund unzureichender Selektivität von Chromatographie und Detektion nicht übertragen werden.

- Die adsorptive Anreicherung der Estrogene an Kohlenstoffelektroden bzw. die Bestimmung von Ethinylestradiol mittels Cathodic Stripping an Quecksilber konnte aufgrund mangelnder Selektivität und ungenügender Nachweisgrenzen nicht als Screening-Methode etabliert werden.

- Die Untersuchungen ergaben, dass die geforderte Bestimmung aller vier Estrogene mit einer Analysenmethode aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Verbindungen nur schwer zu realisieren war. Estriol ließ sich z.B. während der HPLC-Bestimmungen kaum von den Huminstoffen abtrennen, bzw. mittels SPME überhaupt nicht bestimmen.
- Die relativ neue Methode der SPME erwies sich als gut geeignete Probenvorbereitungstechnik zur Anreicherung der Estrogene aus Abwasser. Eine Bestimmung von Estriol war mit dieser Methode jedoch nicht möglich.
- Durch die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (K_{fs} -Werte) an SPME-Phasen konnte aufgezeigt werden, dass der Anreicherungsmechanismus der Estrogene an Polyacrylat wahrscheinlich nicht allein auf eine Verteilung zurückgeführt werden kann.
- Die Untersuchungen zur Derivatisierung machten deutlich, dass in der Literatur oftmals Silylierungsreagenzien zum Einsatz kommen, die keine reproduzierbare Umsetzung der Analyte gewährleisten. Mit der im Rahmen der Arbeit eingesetzten Reagenzmischung aus MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) konnte eine robuste Silylierungsmethode etabliert werden, die alle vier Estrogene unter den gleichen Reaktionsbedingungen zu einheitlichen Derivaten umsetzte.
- Die im Rahmen der LLE-Optimierung als Störkomponente nachgewiesene Lignocerin-säure konnte als mögliche Ursache falsch positiver Ethinylestradiol-Bestimmungen benannt werden.

Um die entwickelten Methoden für weiterführende Untersuchungen einsetzen zu können, wäre als wichtige Verbesserung der Umstieg auf eine neuere und modernere GC/MS- bzw. GC/MS/MS-Anlage zu nennen, da dadurch Bestimmungsgrenzen sicherlich um eine Zehnerpotenz niedriger als die hier erzielten Werte zu realisieren wären. Durch den Selektivitätsgewinn einer MS/MS-Kopplung könnte die Richtigkeit der ermittelten Messwerte abgesichert werden, und so falsch positiven Ergebnissen vorgebeugt werden. Nach weitergehender Optimierung, Automatisierung und Validierung der Methoden

könnten die Verfahren dann für eine flächendeckende Beprobungen von Abwässern und Umweltwässern zum Einsatz kommen. Die SPE-GC/MS könnte auch auf andere Probenmatrices wie ungeklärtes Abwasser oder Klärschlamm ausgeweitet werden. Bei der SPME dürfte dies allerdings aufgrund der extremen Matrixbelastung und damit starken Beanspruchung der Faser nicht realisierbar sein.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Methoden bestünde darin, das Abbauverhalten der Estrogene in der Umwelt zu untersuchen. Die Untersuchungen sollten von einer „Labor-Kläranlage“ ausgehen, in der mit umweltrelevanten Estrogenkonzentrationen zunächst der Abbau simuliert wird. Mögliche Metabolite müssen in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Nach entsprechender Optimierung und Validierung könnte abschließend durch Beprobung verschiedenster Umweltkompartimente eine Bilanzierung des Verbleibs der Estrogene in der Umwelt erfolgen.

Um die Metabolite, die in der Regel polarer als die Ausgangsverbindungen sind, in die Untersuchungen mit einbeziehen zu können, müssen die eingesetzten Probenvorbereitungs- und Analyseverfahren entsprechend verändert werden. Für die Probenvorbereitung wäre z.B. der Einsatz anderer Sorbentien und Anreicherungsphasen denkbar, und auf Seiten der Analytik sicherlich ein Umstieg von der Gaschromatographie auf eine flüssigchromatographische Methode erforderlich. Die Detektion sollte aber in jedem Fall massenspektrometrisch erfolgen, da nur so die erforderliche Selektivität der Messungen gewährleistet werden kann.

Auf methodischer Seite wären weitergehende Untersuchungen des Anreicherungsverhaltens an SPME-Phasen denkbar, da die bisher diskutierten Modelle sicherlich nicht auf alle Analyte und Phasenmaterialien übertragbar sind.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

(Bei den Produkt- und Eigennamen handelt es sich in der Regel um geschützte Markennamen, auch wenn dies nicht explizit angegeben ist.)

7.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

7.1.1 CHEMIKALIEN

A) Lösemittel und Substanzen:

Aceton, p.a.	Merck, Darmstadt
Aceton, ultra resi-analyzed for organic residue analysis	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Acetonitril, HPLC grade S	Rathburn, Walkerburn/ Zinsser Analytic, Frankfurt
Acetonitril, ultra gradient HPLC grade	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Acetonitril, ultra resi-analyzed f. org. residue analysis	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Chloroform, ultra resi-analyzed f. org. residue analysis	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Dichlormethan, Suprasolv f. d. organ. Spurenanalyse	Merck, Darmstadt
di-Natriumtetraborat-Decahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Dioxan, 1,4-, stabilisiert	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Estradiol, β -	Sigma-Aldrich, Steinheim
Estradiol-17-acetat, 17 β -	Riedel-de Haën, Seelze
Estradiol- d_2 , β -(1,3,5[10]-Estratriene-2,4- d_2 -3,17 β -diol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Estriol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Estron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ether, ultra resi-analyzed for organic residue analysis	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethinylestradiol, 17 α -	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylacetat, Suprasolv f. d. organ. Spurenanalyse	Merck, Darmstadt
Extrelut NT Bulkware/Nachfüllpackungen Extrelut 20	Merck, Darmstadt
Hexan, Suprasolv für die organische Spurenanalyse	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid-Lösung (3M, AgCl-gesättigt)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kaliumhydroxid, p.a.	Merck, Darmstadt
Lignocerinsäure (Tetracosansäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol, HPLC gradient grade	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Methanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, Suprasolv für die organische Spurenanalyse	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid, p.a	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat wasserfrei, gekörnt, für die organische Spurenanalyse	Merck, Darmstadt
Ortho-Phosphorsäure, 85%, p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Pufferlösung pH 2,00	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 4,01	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 7,00	Mettler Toledo, Steinbach
Salzsäure, 32%, p.a	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97%, p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Toluol, ultra resi-analyzed for organic residue analysis	Mallinckrodt Baker, Griesheim

Aqua bidest.:

Das Aqua bidest. stammte aus der hauseigenen Destille und wurde zum Ansetzen der Probenlösungen verwendet.

Reinstwasser:

Das Reinstwasser stammte aus der hauseigenen Reinstwasseranlage und diente der Herstellung des HPLC-Fließmittels und des Grundelektrolyten für die Voltammetrie.

Abwasser:

Beim eingesetzten Abwasser handelte es sich um gereinigtes Abwasser des Klärwerks Falkenberg (Berliner Wasserbetriebe, BWB). Das Abwasser wurde sowohl als Matrix zur Herstellung von Probenlösungen verwendet, als auch abschließend selbst beprobt. Die Probennahme wurde durch die Berliner Wasserbetriebe durchgeführt. Nach Erhalt wurde das Abwasser über Quarzfaser-Filter filtriert und bei nicht sofortiger Weiterverwendung im Kühlschrank bei 4-8 °C zwischengelagert. Der Transport und die Lagerung des Abwassers erfolgte in 1l-Borosilikat-Glasflaschen.

B) Derivatisierungsreagenzien für die Gaschromatographie:

BSTFA (N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren
DTE (1,4-Dithioerythrit)	Fluka, Buchs (Schweiz)
MBDSTFA (N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren
MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren

Sylon BTZ (BSA:TMCS:TMSIM / 3:2:3) (N,O-bis(Trimethylsilyl)acetamid:Trimethylchlorsilan: N-Trimethylsilyl-imidazol)	Supelco, Deisenhofen
TMSI (Iodtrimethylsilan, Trimethyliodsilan)	Fluka, Buchs (Schweiz)
TMSIM (N-Trimethylsilyl-imidazol)	Macherey-Nagel, Düren

C) Festphasen für die Festphasenextraktion:

Tabelle 7.1: Sorbensauswahl (siehe Kapitel 3.5.2.1)

Die Angaben in eckigen Klammern stehen für selbst gefüllte Glaskartuschen; EC=endcapped

Baker Butyl , 6 ml, 1 g (Butyl-; trifunktional)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Baker RP18 (EC) , 6 ml, 500 mg (Octadecyl-; trifunktional, EC)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Baker SDB 1 , 3 ml, 200 mg (Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, 966 m ² /g)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Carbograph 1 , 120/400 Mesh, [3 ml, 150 mg] (nicht poröser, graphitisierter Kohlenstoff (GCB), 100 m ² /g)	Alltech, Unterhaching
Isolute C18 (EC) , 3 ml, 500 mg (Octadecyl-; trifunktional, EC)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C18 , 3 ml, 500 mg (Octadecyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C18/ENV+ , 6 ml, 400 mg (C18 + Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, 1100 m ² /g)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C2 (EC) , 3 ml, 500 mg (Ethyl-; trifunktional, EC)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C2 , 3 ml, 500 mg (Ethyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C4 , 3 ml, 500 mg (Butyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C6 , 3 ml, 500 mg (Hexyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg

Isolute C8 (EC) , 3 ml, 500 mg (Octyl-; trifunktional, EC)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute C8 , 3 ml, 500 mg (Octyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute ENV+ , 6 ml, 200 mg (Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, 1100 m ² /g)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute Phenyl (EC) , 3 ml, 500 mg (Phenyl-; trifunktional, EC)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute Phenyl , 3 ml, 500 mg (Phenyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
LiChrolut EN , 40-120 µm, [3 ml, 200 mg] (Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, 1200 m ² /g)	Merck, Darmstadt
LiChrolut RP18 (EC) , 40-63 µm, [8 ml, 1 g] (Octadecyl-; trifunktional, EC)	Merck, Darmstadt
LiChrolut RP18 , 40-63 µm, [8 ml, 1 g] (Octadecyl-; trifunktional)	Merck, Darmstadt
Oasis , 1 ml, 30 mg (N-Vinylpyrrolidon-Divinylbenzol-Copolymer, 810 m ² /g)	Waters, Eschborn
Supelclean Envi-8 , 3 ml, 500 mg (Octyl-, monofunktional, EC)	Supelco, Deisenhofen
Supelclean Envi-18 , 3 ml, 500 mg (Octadecyl-, monofunktional, EC)	Supelco, Deisenhofen
Supelclean Envi-Chrom P , 3 ml, 250 mg (Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, 900 m ² /g)	Supelco, Deisenhofen
Waters tC18 , 6 ml, 1 g (Octadecyl-; trifunktional, EC)	Waters, Eschborn

Tabelle 7.2: Abtrennung von Matrixbestandteilen – „Sandwich“ (siehe Kapitel 3.5.2.4)

Die Angaben in eckigen Klammern stehen für selbst gefüllte Glaskartuschen; EC=endcapped

Isolute CN (EC) , 3 ml, 500 mg (Cyanopropyl-; trifunktional, EC)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
Isolute NH₂ , 3 ml, 500 mg (Aminopropyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg

Isolute PSA , 3 ml, 500 mg (Ethylendiamin-N-propyl-; trifunktional)	IST, Hengoed (UK)/ ICT, Bad Homburg
LiChrolut RP18 , 40-63 μm , [8 ml, 200 mg bzw. 3 ml, 200 mg], (Octadecyl-; trifunktional)	Merck, Darmstadt
LiChrosorb Diol , 10 μm , [3 ml, 500 mg] (1,2-Dihydroxyethoxypropyl-; trifunktional)	Merck, Darmstadt

Tabelle 7.3: Abtrennung von Matrixbestandteilen – „Clean-Up“ (siehe Kapitel 3.5.2.4)

Die Angaben in eckigen Klammern stehen für selbst gefüllte Glaskartuschen

Florisil , [8 ml, 500 mg] (Magnesiumsilikat: MgO/SiO_2 : 15/85)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kieselgel 60 , <230 Mesh, [8 ml, 1 g]	Merck, Darmstadt

7.1.2 GERÄTE UND ARBEITSBEDINGUNGEN

7.1.2.1 Voltammetrie

Metrohm VA Stand 663 mit Autolab	Metrohm/ecochemie
Multimode-Elektrode DME, SMDE, HMDE	Metrohm
Bezugselektrode: Ag/AgCl/3 M KCl	Metrohm
Hilfselektrode: Platin	Metrohm
versch. Kohleelektroden (Glassy Carbon, Graphit...)	verschiedene Hersteller

Cyclische Voltammetrie:

HMDE, -600 bis -100 mV, Scanrate 100 mV/s

Cathodic Stripping:

Anreicherung: HMDE, -150 mV über verschieden lange Zeiten

Stripping: DPP, -150 bis -600 mV

Die Messungen erfolgten aus einem Boratpuffer pH 11,5.

7.1.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Rotationsverdampfer Rotavapor R-114 mit Wasserbad Waterbath B-480	Büchi
Vacuubrand Pumpstand/Vakuum Controller CVC 24	Vacuubrand
Reagenzglasschüttler Heidolph Reax Control	Heidolph-Instruments
Scheidetrichter (2 l) mit Teflonhahn	
Glassäule (für die Na ₂ SO ₄ -Trocknung)	
Extrelut 20 Polypropylensäulen und Filter	Merck
Einmalkanülen, verschiedene Größen	Braun

7.1.2.3 Festphasenextraktion (SPE)

LiChrolut Absaugeinheit für die Festphasenextraktion mit Trocknungsaufsatz	Merck
Vakuumpumpe N726.3FT18	KNF Neuberger GmbH
Glassäulen, 3 ml und 8 ml mit PTFE-Fritten	Merck
PTFE-Adapter	Merck
Teflon Einwegkanülen	Merck
Saugflasche (5 l)	
Rotationsverdampfer Rotavapor R-114 mit Wasserbad Waterbath B-480	Büchi
Vacuubrand Pumpstand/Vakuum Controller CVC 24	Vacuubrand
Reagenzglasschüttler Heidolph Reax Control	Heidolph-Instruments

Durchführung der SPE entsprechend des Fließschemas in Abb. 3.22.

<u>Gefriertrocknung:</u>	Christ Alpha 1-4 (Medizinischer Apparatebau Christ)
	Sollwert Gefrieren: -30 °C
	Sollwert Haupttrocknung: -30 °C / 0,22 mbar
	Sicherheitsdruck Heizung: 0,7 mbar
	Trockenzeit: 7-8 Stunden

7.1.2.4 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Tabelle 7.4: SPME-Fasern (Länge jeweils 10 mm) nach [SCHEPPERS WERCINSKI, 1999]

Beschichtung / Filmdicke	Quarz- faser Ø [mm]	Quarz- faser V [mm ³]	Total Ø [mm]	Total V [mm ³]	Beschich- tung V [mm ³]	Polarität	Max. Temp. [°C]
Polyacrylat, 85 µm	0,110	0,095	0,280	0,616	0,521	polar	320
PDMS, 100 µm	0,110	0,095	0,300	0,707	0,612	unpolar	280
PDMS, 30 µm	0,110	0,095	0,170	0,227	0,132	unpolar	280
PDMS, 7 µm	0,110	0,095	0,124	0,121	0,026	unpolar	340
Carbowax-DVB, 65 µm	0,110	0,095	0,240	0,452	0,357	polar	260
PDMS-DVB, 65 µm	0,110	0,095	0,240	0,452	0,357	bipolar	270
Carboxen-PDMS, 75 µm	0,110	0,095	0,260	0,531	0,436	bipolar	340

Tabelle 7.5: Konditionierung der SPME-Phasen [SUPELCO, 1996]

Beschichtung / Filmdicke	Konditionierungs- temperatur [°C]	Konditionierungs- zeit [h]
Polyacrylat, 85 µm	300	2
PDMS, 100 µm	250	1
PDMS, 30 µm	250	1
PDMS, 7 µm	320	2-4
Carbowax-DVB, 65 µm	250	0,5
PDMS-DVB, 65 µm	260	0,5
Carboxen-PDMS, 75 µm	280	0,5

SPME-Faserhalter

Supelco

4 ml-Gewindeflaschen, klar, PP-Kappen, Silikon/

Amchro

PTFE-Septa

Heizplatte mit Magnetrührwerk IKAMAG RCT basic

IKA Labortechnik

Kontaktthermometer ETS-D4 fuzzy

IKA Labortechnik

Rührstäbchen in versch. Größen, PTFE-ummantelt

diverse Hersteller

Quarzfaser Rundfilter, Ø 50 mm Schleicher & Schuell
 Glas-Vakuumfiltrationsgerät für 50 mm-Filter mit Sartorius
 Glasfritte bzw. PTFE-beschichtetem Lochblech, Saug-
 flasche

Tabelle 7.6: SPME-Bedingungen

		Standardbedingungen	optimierte Bedingungen
Anreicherung	Volumen	3 ml	3 ml
	Temperatur	40 °C	60 °C
	Zeit	15 min	30 min
	Rührgeschw.	1000 U/min	1000 U/min
	pH-Wert	≤8	≤8
	MeOH	1% (V/V)	1% (V/V)
	Salz	keine Zugabe	keine Zugabe
Desorption	Temperatur	280 °C	280 °C
	Zeit	5 min + weitere 5 min bei offenem Split	5 min + weitere 5 min bei offenem Split
	Liner	4 mm einseitig zulaufend	2 mm gerade

Derivatisierung:

Anreicherung: Standard- bzw. optimierte Bedingungen SPME (siehe Tab. 7.6)
 Trocknen der Faser: 100 °C (10 min) im Injektor des GC oder im Umlufttrockenschrank
 Derivatisierung: 3 µl MSTFA mit 1% (V/V) TMSIM, 80 °C, 30 min (Headspace)
 Desorption/GC: Standardbedingungen SPME-GC (siehe 7.1.2.6)

1,5 ml-Probenials, Mikroinserts (100 µl) Agilent
 Heizblockthermostat Test Tube Heater SHT 2D Stuart Scientific
 Mikroliterspritzen (5, 10 und 50 µl) Hamilton

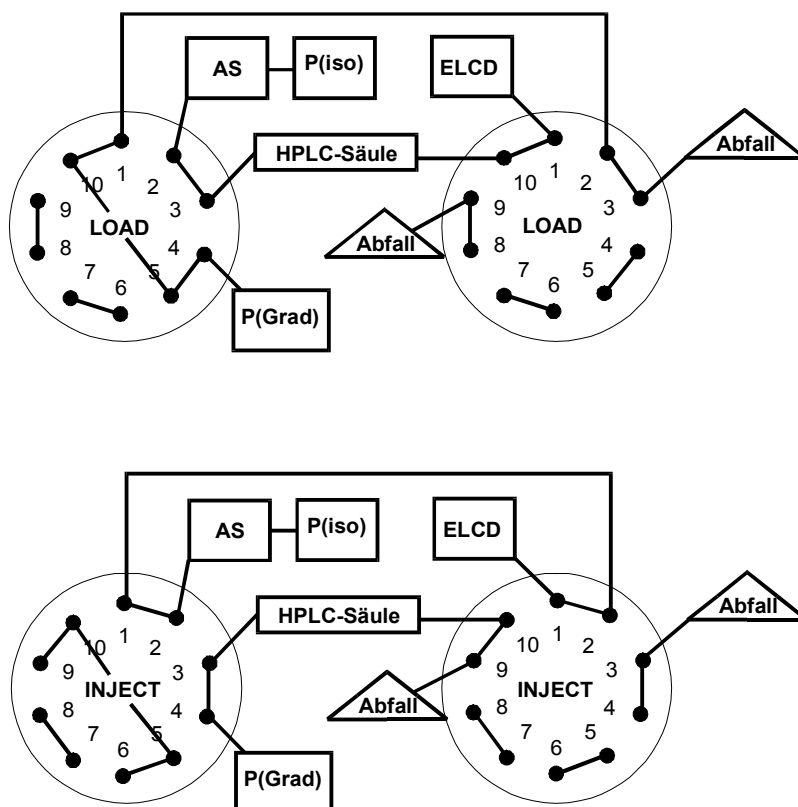
7.1.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**Anlage A: Abimed Pumpe mit UV-Detektor bzw. elektrochemischem Detektor**

Pumpe: HPLC-Pumpe Model 302 mit Manometric Module Model 803
 (Abimed/Gilson); Pulsationsdämpfer (Varian)
 Injektionsventil: Rheodyne 7125 (Rheodyne)
 Säule: LiChroCART 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (Merck)
 Detektor: GAT LCD 500 (Gamma Analysen Technik GmbH)
 Durchflusszelle: 9 µl, 6 mm, λ=208 bzw. 280 nm

- oder: ESA Coulochem II mit Control Module (Model 5200A) und High Sensitivity Analytical Cell (Model 5011) (ESA/Bischoff)
Durchflusszelle vom „frit type“ mit zwei Arbeitselektroden aus porösem Graphit, die zweite mit kleinerem Volumen (Kanal 2);
Polarisationsspannungen: Kanal 1: +250 mV, Kanal 2: +450 mV
Hilfselektrode: Edelstahl
Bezugselektrode: Wasserstoff/Palladium [MATSON, 1983]
- oder: Electrochemical Detector 656 mit 641 VA Detector (Metrohm)
Wall-Jet-Zelle: Zellvolumen <1 µl
Arbeitselektrode: Glassy Carbon
Polarisationsspannung: +1000 mV
Hilfselektrode: Au
Bezugselektrode: Ag/AgCl/3 M KCl
- Schreiber: Zweikanal-Schreiber, Modell 202 (Gamma Analysen Technik GmbH)
- oder Integrator: Varian 4270 Integrator (Varian)
- Fließmittel: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 3,1 (47:53), Fluss: 1,0 ml/min

Anlage B: HPLC-Anlage von Merck/Hitachi mit Säulenschaltung

- Interface: D-6000 Interface (Merck/Hitachi)
- Pumpen: L-6200A Intelligent Pump (Merck/Hitachi)
[Niederdruckgradientenpumpe],
HPLC-Pumpe 307 (Abimed/Gilson) [isokratische Pumpe],
Pulsationsdämpfer (Varian)
- Autosampler: AS-4000 Intelligent Autosampler (Merck/Hitachi)
- Detektoren: L-4250 UV-VIS-Detektor (Merck/Hitachi)
Durchflusszelle: 11,3 µl, 5 mm, $\lambda=208$ bzw. 280 nm
- oder: ESA Coulochem II (ESA/Bischoff) (siehe Anlage A)
- Säule: LiChroCART 125-4 bzw. 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (Merck)
- Fließmittel: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 3,1 (47:53), Fluss: 1,0 ml/min
- Säulenschaltung: Säulenofen Jet Stream 2 Plus (Thermotechnic Products)
mit zwei integrierten elektronischen 10 Port/2 Positionen-Schaltventilen (Valco International)

Säulenschaltung:**Abbildung 7.1:** Säulenschaltung

Oben: Schaltventile in LOAD-Position → Analyse der Probe

Unten: Schaltventile in INJECT-Position → Spülen und Konditionieren der Säule

(AS: Autosampler, ELCD: elektrochemischer Detektor, P_{iso} : isokratische Pumpe, P_{Grad} : Gradientenpumpe)

 P_{iso} :

Die isokratische Pumpe fördert kontinuierlich Fließmittel mit einem Fluss von 1,0 ml/min.

 P_{Grad} :

Die Gradientenpumpe dient dem Spülen und Konditionieren der Säule nach jedem Analysenlauf. Das zugehörige Programm ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 7.7: Programm zur Säulenschaltung

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]	Fließmittel [%]	Fluss [ml/min]	Schaltposition
0.0	100	0	0	0,1	LOAD
15.0	100	0	0	0,1	INJECT
15.1	100	0	0	1,0	INJECT
18.0	100	0	0	1,0	INJECT
18.1	0	100	0	1,0	INJECT
25.0	0	100	0	1,0	INJECT
25.1	0	0	100	1,0	INJECT
35.0	0	0	100	1,0	LOAD
35.1	100	0	0	0,1	LOAD
45.0	100	0	0	0,1	LOAD

Filtration des Fließmittels:

Durapore Membran Filter 0,22 µm

Millipore/Waters

Glas-Vakuumfiltrationsgerät für 50 mm-

Sartorius

Membranfilter mit Glasfritte, Saugflasche (2 l)

7.1.2.6 Gaschromatographie (GC)**Anlage C: Gaschromatograph HP 5890 Series II mit FID**Säule: HP-5 (5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxan)

30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke

Injektor: HP Split/Splitless-Injektor

Detektor: FID

Trärgas: Helium, 70 kPa

Standardbedingungen direkte Injektion der Proben:

Injektortemperatur: 280 °C, 1 min splitless

Temperaturprogramm GC: 100 °C (3 min) – 30 °C/min – 230 °C – 3 °C/min – 300 °C
(5 min)Standardbedingungen SPME:

Injektortemperatur: 280 °C, 5 min splitless

Temperaturprogramm GC: 100 °C (5 min) – 30 °C/min – 230 °C – 3 °C/min – 300 °C
(5 min)

Anlage D: Gaschromatograph HP 5890 Series II mit Mass Spectrometer 5989B

Säulen: HP-5 MS (5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxan)
30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Restek Rtx 5 (5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxan)
30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (verändertes Temperaturprogramm!)

Injektor: HP Split/Splitless-Injektor
oder: KAS 3 (Gerstel)

Detektor: Mass Spectrometer HP 5989B (Quadrupol)
EI: 70 eV, Massenbereich: 1-1000 amu
Tuning: Atune (automatic tuning) oder Eisens (EI sensitivity tuning),
Tuninggas: PFTBA
Scan oder SIM (selected ion monitoring)

Trärgas: Helium, 70 kPa

Standardbedingungen direkte Injektion der Proben:

Siehe Anlage C!

Verändertes Temperaturprogramm für Restek Rtx 5:

100 °C (3 min) – 30 °C/min – 230 °C – **1,5 °C/min** – 300 °C (5 min)

Standardbedingungen SPME:

Siehe Anlage C!

Verändertes Temperaturprogramm für Restek Rtx 5:

100 °C (5 min) – 30 °C/min – 230 °C – **1,5 °C/min** – 300 °C (5 min)

Derivatisierung:

Die Probenlösung wird in ein Probenvial überführt, zur Trockene eingeeengt und im Anschluss mit 50 µl Derivatisierungsreagenz wieder aufgenommen. Die Umsetzung erfolgt standardmäßig für 30 min bei 80 °C in einem Heizblockthermostat. Als Reagenz zur direkten Derivatisierung der Estrogene hat sich eine Mischung aus MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) bewährt.

Zubehör/Verbrauchsmaterial:

Septa grau, mit geringem Blüten	Agilent
Liner, 4 mm ID, einseitig zulaufend	Agilent
Liner, 2 mm ID, gerade	Agilent

SPME-Liner, 0,75 mm ID, gerade	Supelco
10 µl-Spritze, 23 Gauge, gerade	Agilent
5 µl-Spritze, 23 Gauge, gerade	Agilent
1,5 ml-Probenvials	Agilent
Mikroliterspritzen (5, 10 und 50 µl)	Hamilton
Heizblockthermostat Test Tube Heater SHT 2D	Stuart Scientific

7.1.2.7 Weitere Geräte

Analysenwaage Sartorius AC 211 P	Sartorius
Analysenwaage Sartorius BP 211 D	Sartorius
Oberschalenwaage Sartorius Portable PT 210	Sartorius
Digital pH Meter pH 525	WTW
pH-Einstabmesskette Typ Nr. N 6280	Schott Geräte
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 100	Bandelin Electronic
Umluft-Trockenschrank UT 6060	Heraeus Instruments
UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101 PC	Shimadzu
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 0,5-10 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 10-100 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 100-1000 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz
Kurzzeitwecker	Oregon Scientific
Parafilm	American National Can
Glasflaschen 1l klar, Borosilikat-Glas	
Vollpipetten	
diverse Glasgeräte	

7.2 ARBEITSVORSCHRIFTEN

Estrogen-Stammlösungen:

Für die vier untersuchten Estrogene werden getrennte Stammlösungen angesetzt, aus denen bei Bedarf die benötigten Arbeitslösungen hergestellt werden. Die Stammlösungen werden im Kühlschrank bei 4-8 °C gelagert und alle 8 Wochen neu hergestellt. Die Stabilität der Lösungen über diesen Zeitraum konnte durch HPLC/UVD belegt werden.

Stammlösung E1:	10,0 mg Estron in 100,0 ml Methanol HPLC gradient grade
Stammlösung E2:	10,0 mg Estradiol in 100,0 ml Methanol HPLC gradient grade
Stammlösung EE2:	10,0 mg Ethinylestradiol in 100,0 ml Methanol HPLC gradient grade
Stammlösung E3:	10,0 mg Estriol in 100,0 ml Methanol HPLC gradient grade
Stammlösung d_2 -E2:	1,0 mg Estradiol- d_2 in 10,0 ml Methanol HPLC gradient grade
Stammlösung E2-17ac:	10,0 mg Estradiol-17-acetat in 100,0 ml Methanol HPLC gradient grade

CATHODIC STRIPPING

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.1

Grundelektrolyt: 0,05 M Boratpuffer pH 11,5 / Methanol (50:50)

Anreicherungs- und Kalibrierlösungen:

12,0 mg Ethinylestradiol werden in 100,0 mg Methanol gelöst. Durch Verdünnen von 1,0 ml dieser Lösung auf 100,0 ml Methanol wird eine Arbeitslösung hergestellt (Konz. 120 µg/100 ml). 200 µl dieser Arbeitslösung enthalten 240 ng EE2. Durch Pipettieren entsprechender Volumina und Auffüllen mit Grundelektrolyt auf 20,0 ml werden die Kalibrierlösungen erhalten.

Konz.[ppb]	V _{ArbeitsLsg} [µl]	V _{Grundelektrol.} [ml]
12	200	19,8
24	400	19,6
36	600	19,4
48	800	19,2
60	1000	19,0
72	1200	18,8

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.5

Fließmittel für die HPLC: Phosphatpuffer (50 mM, pH 3,1)/Acetonitril: (53:47)

Die Herstellung des FM erfolgt bei Verwendung der isokratischen Abimed-Pumpe durch Mischen von 530 ml Phosphatpuffer und 470 ml Acetonitril vor der HPLC bzw. bei Verwendung der Merck-Anlage direkt online über den Niederdruckgradienten.

UV-Detektion:

Jeweils 10,0 ml der Estrogen-Stammlösungen werden mit FM auf 100,0 ml aufgefüllt, so dass eine 1:10-Mischung der Estrogene erhalten wird (Konz.: 1 mg/100 ml bzw. 100 ng/10 µl). Durch Pipettieren entsprechender Volumina und erneutes Auffüllen mit FM zu 10,0 ml werden folgende Kalibrierlösungen hergestellt:

0,5 ng/10 µl; 1,0 ng/10 µl; 2,5 ng/10 µl; 5 ng/10 µl; 7,5 ng/10 µl; 10 ng/10 µl;

25 ng/10 µl; 50 ng/10 µl; 75 ng/10 µl; 100 ng/10 µl

Das Injektionsvolumen beträgt 10 µl.

Elektrochemische Detektion:

In einem 100 ml-Maßkolben wird durch Zugabe von jeweils 1,0 ml der Estrogen-Stammlösungen und anschließendem Auffüllen mit FM eine 1:100-Mischung der Estrogene (Konz.: 100 µg/100 ml bzw. 10 ng/10 µl) hergestellt. Von dieser Lösung werden entsprechende Volumina pipettiert und wiederum mit FM auf 10,0 ml aufgefüllt. Dies ergibt Kalibrierlösungen der folgenden Konzentrationen:

10 pg/10 µl; 25 pg/10 µl; 50 pg/10 µl; 75 pg/10 µl; 100 pg/10 µl

GASCHROMATOGRAPHIE

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.6

Kalibrierung ohne Derivatisierung: 10-50 ng/µl

Es wird eine Stammlösung hergestellt, die 10,0 mg E1 und E2 in 100,0 ml MeOH enthält. Die zu vermessenden Standardlösungen werden entsprechend der folgenden Aufstellung unter Zugabe von Estradiol-17-acetat als internem Standard und MeOH hergestellt.

Konz.[ng/µl] E1/E2	Konz.[ng/µl] E2-17ac	V _{StLsg} [µl] E1/E2	V _{StLsg} [µl] E2-17ac	V [µl] MeOH
10	50	100	500	400
20	50	200	500	300
30	50	300	500	200
40	50	400	500	100
50	50	500	500	-

Ermittlung geeigneter Derivatisierungsbedingungen für die Silylierung:

Die Derivatisierungsansätze werden für alle vier Estrogene (E1, E2, EE2 und E3) getrennt hergestellt. Dazu werden 50 µl der jeweiligen Estrogen-Stammlösung mit 50 µl der Stammlösung des internen Standards (Estradiol- d_2) versetzt und mit Argon zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wird mit 50 µl des entsprechenden Reagenzgemisches wieder aufgenommen und bei 80 °C im Heizblockthermostat bzw. bei Raumtemperatur umgesetzt. Zu vorgegebenen Zeitpunkten wird 1 µl der Lösung mittels GC/MS im Scan-Modus untersucht. Die Konzentration der Proben beträgt 100 ng/µl.

Die Messzeitpunkte lagen für die 80 °C-Umsetzung bei 30 min, 1 h, 2 h und 3 h. Daraufhin wurden die Proben über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am folgenden Tag nochmals vermessen. Die Derivatisierungen bei Raumtemperatur wurde nach 24 h und 48 h überprüft.

Mischungen von Derivatisierungsreagenzien:

Die Prozentangaben stehen jeweils für Volumenprozent. MSTFA mit 1% TSMIM bedeutet daher, dass 1 µl TSMIM in 100 µl der Reagenzmischung enthalten sind.

MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4)

Diese Reagenzmischung wurde aus 1000 µl MSTFA unter Zugabe von 2 mg DTE und 4 µl TMSI hergestellt.

Kalibrierung nach Derivatisierung: 50-250 pg/µl

In einen 10 ml-Maßkolben werden jeweils 1,0 ml der Estrogen-Stammlösungen pipettiert und anschließend mit MeOH auf 10,0 ml aufgefüllt (Konz.: 1 mg/100 ml bzw. 10 ng/1 µl). Die erhaltene Mischung wird nochmals 1:100 mit MeOH verdünnt, so dass letztendlich eine Konzentration von 100 pg/1 µl erhalten wird. Die Stammlösung des internen Standards Estradiol- d_2 wird ebenfalls mit MeOH 1:1000 verdünnt.

Durch Pipettieren der angegebenen Volumina werden die Kalibrierlösungen erhalten:

Konz.[pg/µl]	Konz.[pg/µl]	V _{1:1000} [µl]	V _{1:1000} [µl]
E1/E2/EE2/E3	d_2 -E2	E1/E2/EE2/E3	d_2 -E2
50	400	25	200
100	400	50	200
150	400	75	200
200	400	100	200
250	400	125	200

Das Lösemittel wird unter Argon zur Trockene abgeblasen und der Rückstand in 50 µl Derivatisierungsreagenz (MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4)) wieder aufgenommen. Die Derivatisierung erfolgt bei 80 °C für 60 min im Heizblockthermostat.

FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.2

Klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion:

Probenlösung 2 µg/500 ml E1,E2,EE2 und E3:

Jeweils 1,0 ml der Estrogen-Stammlösungen werden mit Methanol zu 10,0 ml ergänzt. 200 µl dieser Mischung werden mit Aqua bidest. bzw. Abwasser zu 500,0 ml ergänzt.

Extraktion:

Die verwendeten Lösemittel werden zunächst mit Aqua bidest. wassergesättigt.

Die Extraktion erfolgt durch dreimaliges Ausschütteln mit 50 ml Lösemittel in einem Scheidetrichter. Die Probe wird hierzu jeweils fünfmal für mindestens 1 min kräftig per Hand geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die organische Phase über 40 g Natriumsulfat in einer Glassäule getrocknet. Das Natriumsulfat wird mit dem verwendeten Lösemittel nachgespült (50 ml) und die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in einen 10 ml-Spitzkolben überführt und nach erneutem Abdampfen mit 2,0 ml Fließmittel zur HPLC aufgenommen. Soll zusätzlich eine Messung mittels GC/MS erfolgen, so wird die Probe nach dem Überführen in den Spitzkolben mit 1,0 ml Lösemittel aufgenommen, geteilt und abermals abrotiert. Für die HPLC-Bestimmung wird der Rückstand in 1,0 ml Fließmittel aufgenommen bzw. für die GC-Bestimmung mit 50 µl Derivatisierungsreagenz versetzt.

Sorbensgestützte Flüssig-Flüssig-Extraktion:

Probenlösung 2 µg/20 ml bzw. 20 ng/20 ml E1,E2,EE2 und E3:

Jeweils 1,0 ml der Estrogen-Stammlösungen werden mit Methanol zu 10,0 ml ergänzt. Für die Probenlösung der Konzentration 20 ng/20 ml wird diese Mischung noch einmal 1:100 verdünnt. 200 µl der jeweiligen Verdünnung werden mit Aqua bidest. bzw. Abwasser zu 20,0 ml aufgefüllt.

Extraktion:

20 ml Probenlösung werden auf eine Extrelut-Säule aufgegeben. Nach 15 min erfolgt die Elution durch Aufgabe von 40 ml des jeweiligen Elutionsmittel. Das Eluat wird in einem Kolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer zur Trockene abgedampft. Der Rückstand wird in 2,0 ml HPLC-Fließmittel aufgenommen und analysiert.

FESTPHASENEXTRAKTION

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.3

Anreicherungslösung 1 µg/100 ml bzw. 1 µg/1 l:

Je 1,0 ml der Estrogen-Stammlösungen werden zusammen mit Methanol zu 100,0 ml verdünnt. Von dieser Mischung werden 1,0 ml zu 100,0 ml bzw. 1000,0 ml Aqua bidest. oder Abwasser ergänzt.

Anreicherung:

Die Probenlösungen werden durch zuvor konditionierte SPE-Kartuschen gesaugt. Nach einem Waschschrift erfolgt die Gefriertrocknung der Kartuschen. Die angereicherten Analyte werden mit einem geeigneten Lösemittel eluiert. Vor der analytischen Bestimmung mittels HPLC oder GC kann das Eluat noch einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen werden. Das Fließschema zur SPE-Anreicherung der Estrogene ist in Abb. 3.22 angegeben.

Messung mittels HPLC/ELCD:

Das Eluat wird einrotiert und der Rückstand in 1,0 ml HPLC-Fließmittel wieder aufgenommen. 10 µl dieser Lösung werden unter Verwendung der Säulenschaltung (Anlage B) an einer 25 cm RP-18-Säule chromatographiert (ESA Coulochem II: 450 mV).

Messung mittels GC/MS:

Das Eluat nach SPE wird zur Trockene eingedampft und mit 50 µl des Derivatisierungsreagenzes (MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) für 1 h bei 80 °C umgesetzt. 2 µl dieser Lösung werden in den GC/MS injiziert.

Kalibrierlösungen für die SPE-GC/MS:

Jeweils 1,0 ml der jeweiligen Estrogen-Stammlösung werden mit Methanol zu 100,0 ml verdünnt (1 µg/1 ml). Diese Mischung wird erneut mit Methanol 1:100 verdünnt (10 ng/1 ml). Die gleichen Verdünnungsschritte werden mit der Stammlösung des internen Standards Estradiol- d_2 durchgeführt.

Die Kalibrierlösungen werden durch Pipettieren der angegebenen Volumina auf 1 l Wasser erhalten:

Konz.[ng/l]	Konz.[ng/l]	V _{1:10000} [µl]	V _{1:10000} [µl]	V [µl]
E1/E2/EE2/E3	d_2 -E2	E1/E2/EE2/E3	d_2 -E2	MeOH
1,0	10,0	100	1000	1150
2,5	10,0	250	1000	1000
5,0	10,0	500	1000	750
7,5	10,0	750	1000	500
10,0	10,0	1000	1000	250
12,5	10,0	1250	1000	-

FESTPHASENMIKROEXTRAKTION

Verwendete Geräte: siehe 7.1.2.4

SPME-Stammlösung

In einen Maßkolben werden jeweils 10,0 mg E1, E2 und EE2 eingewogen und mit MeOH zu 100,0 ml aufgefüllt.

Anreicherungslösung, 500 ppb (500 µg/l), 1% (V/V) MeOH:

500 µl der SPME-Stammlösung werden mit 500 µl Methanol auf 100,0 ml mit Aqua bidest. ergänzt.

Anreicherung:

Die Anreicherungsbedingungen entsprechen den Standard- bzw. optimierten SPME-Bedingungen in Tab. 7.6.

Variation des Salzgehaltes:

Die Salzgehalte sind in % (m/V) angegeben, d.h. eine 1%ige Lösung enthält 30 mg NaCl in 3 ml Lösung, eine 5%ige 150 mg NaCl in 3 ml Lösung usw.

Derivatisierung

Zur Derivatisierung wird die SPME-Faser nach der Anreicherung im GC-Injektor bzw. im Trockenschrank für 10 min bei 100 °C getrocknet. Die Umsetzung erfolgt als Head-space-Derivatisierung mit 3 µl MSTFA mit 1% (V/V) TMSIM für 30 min bei 80 °C im Heizblockthermostat.

Kalibrierung ohne Derivatisierung: 1-10 µg/l

Aus den Stammlösungen von E1 und E2 wird durch Zugabe von MeOH eine 1:10-verdünnte Mischung hergestellt (1 mg/100 ml bzw. 10 ng/1 µl). Die Stammlösung des internen Standards d_2 -E2 wird ebenfalls mit MeOH 1:10 verdünnt. Die Herstellung der Kalibrierlösungen erfolgt durch entsprechende Zugabe dieser 1:10-Verdünnungen zu Aqua bidest. bzw. Abwasser. Durch Zusatz von Methanol wird der Methanolgehalt auf 1% (V/V) eingestellt. Die Lösungen werden mit Aqua bidest. bzw. Abwasser zu 100,0 ml ergänzt.

Konz.[µg/l]	Konz.[µg/l]	V _{1:10} [µl]	V _{1:10} [µl]	V [µl]
E1/E2	d_2 -E2	E1/E2	d_2 -E2	MeOH
1,0	2,0	10	20	970
2,5	2,0	25	20	955
5,0	2,0	50	20	930
7,5	2,0	75	20	905
10,0	2,0	100	20	880

Die Anreicherung erfolgt entsprechend den optimierten SPME-Bedingungen. Die Messung wird am GC/MS im SIM-Modus durchgeführt.

Kalibrierung nach Derivatisierung: 10-100 ng/l

Aus den Stammlösungen von E1, E2 und EE2 wird eine 1:1000-Mischung mit MeOH hergestellt (10 µg/100 ml bzw. 100 pg/1 µl). Die Stammlösung des internen Standards wird ebenfalls 1:1000 verdünnt. Die Herstellung der Anreicherungs-lösungen erfolgt entsprechend der Kalibrierung ohne Derivatisierung durch Zugabe der angegebenen Volumina zu 100,0 ml Lösung.

Konz.[ng/l] E1/E2/EE2	Konz.[ng/l] <i>d</i> ₂ -E2	V _{1:1000} [µl] E1/E2/EE2	V _{1:1000} [µl] <i>d</i> ₂ -E2	V [µl] MeOH
10	50	10	50	940
25	50	25	50	925
50	50	50	50	900
75	50	75	50	875
100	50	100	50	850

Die Anreicherung wird wieder unter den optimierten SPME-Bedingungen durchgeführt, die Messung erfolgt nach Derivatisierung im SIM-Modus am GC/MS.

Verteilungskoeffizienten:

Die SPME-Stammlösung wird mit MeOH 1:10 verdünnt. 0,5 ml dieser Lösung werden nach Zugabe von 0,5 ml MeOH mit Aqua bidest. zu 100,0 ml ergänzt. Die erhaltene Anreicherungs-lösung hat eine Konzentration von 50 ppb (50 µg/l) und einen Methanolgehalt von 1% (V/V). Die Anreicherung erfolgt über einen Zeitraum von 22 h.

REALPROBEN:**Festphasenextraktion:**

Die Kalibrierlösungen werden analog der Arbeitsvorschrift für die SPE in 1 l Aqua bidest. hergestellt. Die Konzentration des internen Standards *d*₂-E2 beträgt jeweils 10 ng/l. Folgende Konzentrationen werden vermessen: 1 ng/l; 2,5 ng/l; 5 ng/l; 7,5 ng/l; 10 ng/l; 25 ng/l; 50 ng/l. Die Anreicherung erfolgt entsprechend des SPE-Ablaufschemas in Abb. 3.22 unter Weglassen des Waschschrilles mit H₂O/MeOH (6:4). Das Eluat wird zur Trockene eingedampft und mit 50 µl des Derivatisierungsreagenzes MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4) für 1 h bei 80 °C umgesetzt. 2 µl dieser Lösung werden in den GC/MS injiziert. Die Messung erfolgt im SIM-Modus.

Nach Zusatz des internen Standards wird mit den Realproben in gleicher Weise verfahren.

Festphasenmikroextraktion:

Die Kalibrierlösungen werden auch hier analog der Arbeitsvorschrift für die SPME in 100 ml Aqua bidest. hergestellt. Die Konzentrationen sind dabei 10 ng/l; 25 ng/l; 50 ng/l; 75 ng/l und 100 ng/l. Die Konzentration des internen Standards *d*₂-E2 beträgt jeweils

50 ng/l. Nach Anreicherung unter den optimierten SPME-Bedingungen erfolgt die Derivatisierung an der Faser mit MSTFA mit 1% (V/V) TMSIM. Die abschließende Messung wird am GC/MS im SIM-Modus durchgeführt.

Die Messung der Realproben erfolgt nach Zusatz des internen Standards auf gleiche Art und Weise.

8 ANHANG

8.1 WERTETABELLEN

8.1.1 VOLTAMMETRIE

Tabelle 8.1: Kalibrierung von Ethinylestradiol im Konzentrationsbereich von 24-72 µg/l

Cathodic Stripping: Anreicherung: -150mV, 150s; Stripping: -150 bis -600mV

EE2			
Konz.	Stromstärke	Konz.	Stromstärke
µg/l	nA	µg/l	nA
24	5,92	60	21,5
24	6,42	60	21,6
24	6,56	60	21,2
24	6,66	60	21,5
36	11,7	72	26,8
36	12,0	72	26,5
36	11,8	72	26,7
36	11,7	72	26,1
48	16,8		
48	16,9		
48	16,5		
48	16,9		

Konz.	EE2		
µg/l	Mw	Stabw	Vk
24	6,39	0,3284	5,14%
36	11,80	0,1414	1,20%
48	16,78	0,1893	1,13%
60	21,45	0,1732	0,81%
72	26,53	0,3096	1,17%

LINEARER AUSGLEICH:	EE2
Ordinatenabschnitt b:	-3,2335
Steigung m:	0,4136
Reststandardabweichung s_y:	0,2819
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	0,6816
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9986
Anzahl der Messwerte n:	20

8.1.2 HPLC/UVD

Tabelle 8.2: Molare und spezifische Absorptionskoeffizienten der Estrogene
aus eigenen Messungen berechnet, Konz.: 4mg/100ml, UV-VIS-Scanning Spectrometer
UV-2101 PC (Shimadzu)

	208 nm		280 nm	
	$\epsilon (A_{1\text{cm}}^{1\text{mol}})$	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	$\epsilon (A_{1\text{cm}}^{1\text{mol}})$	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
E1	15429	571	2218	82
E2	15545	571	2234	82
EE2	16453	571	2365	82
E3	16904	570	2430	82

8.1.3 HPLC/ELCD

Tabelle 8.3: Kalibrierung der Estrogene im Konzentrationsbereich von 10-100 pg/10 μl
HPLC: Anlage A; ESA Kanal 1: 250mV, Kanal 2: 450mV; Fluss: 0,5ml/min; Integrator; manuelle
Injektion von 10 μl ; n=3

	E1	E2	EE2	E3
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche
pg/10 μl	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert
10	4.285	5.644	4.515	10.756
10	3.801	5.054	5.833	11.623
10	4.012	5.312	5.590	10.526
25	9.006	11.857	9.428	22.134
25	8.756	11.725	8.914	26.620
25	8.986	11.085	9.455	28.567
50	17.040	22.589	15.911	33.622
50	17.094	21.904	16.165	32.431
50	17.797	22.664	16.922	38.456
75	26.071	34.540	25.668	51.006
75	25.786	33.709	25.764	51.086
75	27.983	34.811	25.998	65.607
100	33.848	45.059	35.859	67.495
100	33.845	46.145	34.229	63.450
100	35.385	45.359	34.404	77.059

Konz.	E1			E2		
pg/10µl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
10	4.033	242,6	6,01%	5.337	295,6	5,54%
25	8.916	138,9	1,56%	11.556	412,9	3,57%
50	17.310	422,7	2,44%	22.386	419,0	1,87%
75	26.613	1.194,7	4,49%	34.354	574,3	1,67%
100	34.359	888,7	2,59%	45.521	560,7	1,23%

Konz.	EE2			E3		
pg/10µl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
10	5.313	701,6	13,21%	10.968	578,6	5,27%
25	9.265	304,5	3,29%	25.774	3.298,8	12,80%
50	16.333	525,9	3,22%	34.836	3.190,5	9,16%
75	25.810	169,4	0,66%	55.900	8.406,5	15,04%
100	34.831	895,1	2,57%	69.334	6.988,7	10,08%

LINEARER AUSGLEICH:	E1	E2	EE2	E3
Ordinatenabschnitt b:	523,33	472,08	1144,05	6313,80
Steigung m:	340,83	449,20	330,12	635,55
Reststandardabweichung s_y:	692,87	532,94	972,28	5352,59
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	2,033	1,186	2,945	8,422
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9967	0,9989	0,9930	0,9455
Anzahl der Messwerte n:	15	15	15	15

8.1.4 KALIBRIERUNG DER ESTROGENE OHNE DERIVATISIERUNG – GC/FID UND GC/MS

Tabelle 8.4: Kalibrierung der Estrogene ohne Derivatisierung im Konzentrationsbereich von 10-50 ng/μl – **GC/FID**

GC/FID, IS: Estradiol-17-acetat, 50ng/μl; Injektionsvolumen: 1μl, manuell; n=3

	E2-17ac	E1	E2	E1/E2-17ac	E2/E2-17ac
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
ng/μl	Zählwert	Zählwert	Zählwert		
10	6.267	1.059	870	0,1690	0,1388
10	23.318	5.040	4.600	0,2161	0,1973
10	3.104	691	572	0,2226	0,1843
20	4.762	1.921	1.308	0,4034	0,2747
20	22.469	9.616	8.754	0,4280	0,3896
20	3.423	1.426	1.205	0,4166	0,3520
30	9.365	5.963	5.137	0,6367	0,5485
30	7.609	4.710	3.888	0,6190	0,5110
30	3.691	2.481	1.809	0,6722	0,4901
40	9.659	8.376	7.309	0,8672	0,7567
40	7.008	6.240	5.102	0,8904	0,7280
40	9.105	8.364	7.549	0,9186	0,8291
50	16.937	18.762	16.957	1,1078	1,0012
50	3.015	3.298	2.591	1,0939	0,8594
50	4.146	4.828	4.052	1,1645	0,9773

Konz.	E1/E2-17ac			E2/E2-17ac		
ng/μl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
10	0,2026	0,0293	14,45%	0,1735	0,0307	17,69%
20	0,4160	0,0123	2,96%	0,3388	0,0586	17,30%
30	0,6426	0,0271	4,21%	0,5165	0,0296	5,73%
40	0,8921	0,0258	2,89%	0,7713	0,0521	6,75%
50	1,1220	0,0374	3,34%	0,9460	0,0759	8,03%

LINEARER AUSGLEICH:	E1/E2-17ac	E2/E2-17ac
Ordinatenabschnitt b:	-0,0394	-0,0441
Steigung m:	0,0231	0,0198
Reststandardabweichung s_y:	0,0259	0,0512
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	1,1212	2,5859
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9946	0,9718
Anzahl der Messwerte n:	15	15

Tabelle 8.5: Kalibrierung der Estrogene ohne Derivatisierung im Konzentrationsbereich von 10-50 ng/μl – GC/MS

IS: Estradiol-17-acetat, 50ng/μl; Injektionsvolumen: 1μl, manuell; n=3

GC/MS: Messung im SIM: Berechnung jeweils über die fettgedruckte Masse (Molekülion)

E1: 185,2+**270,2**; E2: 213,2+**272,2**, E2-17ac: 172,15+**314,2**

	E2-17ac	E1	E2	E1/E2-17ac	E2/E2-17ac
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
ng/μl	Zählwert	Zählwert	Zählwert		
10	33.817	5.407	3.956	0,1599	0,1170
10	21.397	4.937	2.226	0,2307	0,1040
10	34.358	4.828	3.690	0,1405	0,1074
20	49.210	17.568	12.586	0,3570	0,2558
20	42.825	12.249	9.555	0,2860	0,2231
20	38.622	15.473	8.267	0,4006	0,2140
30	54.879	29.053	27.952	0,5294	0,5093
30	48.663	24.476	18.827	0,5030	0,3869
30	28.611	24.488	12.034	0,8559	0,4206
40	61.964	54.044	44.442	0,8722	0,7172
40	66.054	54.338	47.551	0,8226	0,7199
40	24.126	22.806	17.512	0,9453	0,7259
50	95.275	131.634	117.360	1,3816	1,2318
50	51.879	59.699	60.543	1,1507	1,1670
50	25.889	48.604	31.880	1,8774	1,2314

Konz.	E1/E2-17ac			E2/E2-17ac		
ng/μl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
10	0,1770	0,0475	26,82%	0,1095	0,0067	6,14%
20	0,3479	0,0578	16,63%	0,2310	0,0219	9,50%
30	0,6294	0,1966	31,23%	0,4389	0,0633	14,41%
40	0,8800	0,0617	7,01%	0,7210	0,0044	0,61%
50	1,4699	0,3713	25,26%	1,2101	0,0373	3,08%

8.1.5 KALIBRIERUNG DER ESTROGENE NACH DERIVATISIERUNG – GC/MS

Tabelle 8.6: Kalibrierung der Estrogene nach Derivatisierung im Konzentrationsbereich von 50-250 pg/μl – **GC/MS**

IS: d_2 -Estradiol, 400pg/μl; Injektionsvolumen: 1μl, manuell; n=2

Derivatisierung: 50μl MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4), 80°C, 60min

GC/MS: Messung im SIM: Berechnung jeweils über die fettgedruckte Masse

E1-TMS(2): 399,2+414,2; E2-TMS(2): 285,2+416,2; d_2 -E2-TMS(2): 287,2+418,2; EE2-TMS(2): 285,2+425,2+440,2; E3-TMS(3): 386,2+504,35

	d_2 -E2	E1	E2	EE2	E3
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche
pg/μl	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert
50	607.714	29.209	94.689	21.869	33.289
50	190.911	11.779	33.238	7.424	12.696
100	500.141	55.000	145.044	35.717	53.611
100	237.170	27.915	74.684	19.958	29.060
150	506.585	78.963	213.306	51.990	82.137
150	263.479	43.767	120.153	30.759	46.761
200	565.063	119.215	314.782	78.175	117.188
200	254.647	58.923	144.083	36.244	59.807
250	542.554	146.363	373.122	91.597	135.418
250	372.070	113.796	264.428	69.145	109.359

Konz.	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2	E3/ d_2 -E2
pg/μl	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
50	0,0481	0,1558	0,0360	0,0548
50	0,0617	0,1741	0,0389	0,0665
100	0,1100	0,2900	0,0714	0,1072
100	0,1177	0,3149	0,0842	0,1225
150	0,1559	0,4211	0,1026	0,1621
150	0,1661	0,4560	0,1167	0,1775
200	0,2110	0,5571	0,1383	0,2074
200	0,2314	0,5658	0,1423	0,2349
250	0,2698	0,6877	0,1688	0,2496
250	0,3058	0,7107	0,1858	0,2939

Konz.	E1/d₂-E2			E2/d₂-E2		
pg/μl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
50	0,0549	0,0096	17,57%	0,1650	0,0129	7,84%
100	0,1138	0,0055	4,80%	0,3025	0,0176	5,82%
150	0,1610	0,0072	4,50%	0,4385	0,0247	5,64%
200	0,2212	0,0144	6,53%	0,5614	0,0062	1,10%
250	0,2878	0,0255	8,86%	0,6992	0,0162	2,32%

Konz.	EE2/d₂-E2			E3/d₂-E2		
pg/μl	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
50	0,0374	0,0021	5,48%	0,0606	0,0083	13,67%
100	0,0778	0,0090	11,58%	0,1149	0,0108	9,44%
150	0,1097	0,0100	9,10%	0,1698	0,0108	6,39%
200	0,1403	0,0028	2,01%	0,2211	0,0194	8,79%
250	0,1773	0,0120	6,78%	0,2718	0,0313	11,53%

LINEARER AUSGLEICH:	E1/d₂-E2	E2/d₂-E2	EE2/d₂-E2	E3/d₂-E2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0042	0,0351	0,0058	0,0091
Steigung m:	0,0011	0,0027	0,0007	0,0011
Reststandardabweichung s_y:	0,0125	0,0137	0,0070	0,0145
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	11,364	5,074	10,0	13,182
Bestimmtheitsmaß R²:	0,9814	0,9957	0,9836	0,9708
Anzahl der Messwerte n:	10	10	10	10

8.1.6 SPE-GC/MS

Tabelle 8.7a: Kalibrierung der Estrogene nach SPE-Anreicherung und Derivatisierung mittels GC/MSIS: d_2 -Estradiol, 10ng/l

SPE: Anreicherung von 1l Probe entsprechend SPE-Fließschema in Abb. 3.22

Derivatisierung: 50µl MSTFA:DTE:TMSI (1000:2:4), 80°C, 60min

GC/MS: Messung im SIM: Berechnung jeweils über die fettgedruckte Masse

E1-TMS(2): 399,2+**414,2**; E2-TMS(2): 285,2+**416,2**; d_2 -E2-TMS(2): 287,15+**418,2**; EE2-TMS(2):285,15+**425,2**+440,2; E3-TMS(3): 386,2+**504,35**

Injektionsvolumen: 2µl, manuell; n=1

	d_2 -E2	E1	E2	EE2	E3
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche
ng/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert
1,0	854.013	49.048	128.024	49.658	18.582
2,5	1.316.533	203.670	403.854	210.333	29.796
5,0	1.193.495	302.050	2.006.650	265.343	18.070
7,5	882.594	450.001	717.418	328.996	77.845
10,0	1.244.539	774.490	1.287.254	572.695	114.906
12,5	965.844	757.380	1.223.196	563.081	32.014

Konz.	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2	E3/ d_2 -E2
ng/l	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
1,0	0,0574	0,1499	0,0581	0,0218
2,5	0,1547	0,3068	0,1598	0,0226
5,0	0,2531	0,5583	0,2223	0,0151
7,5	0,5099	0,8129	0,3728	0,0882
10,0	0,6223	1,0343	0,4602	0,0923
12,5	0,7842	1,2665	0,5830	0,0331

LINEARER AUSGLEICH	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2	E3/ d_2 -E2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0153	0,0651	0,0241	0,0193
Steigung m:	0,0642	0,0971	0,0445	0,0041
Reststandardabweichung s_y:	0,0349	0,0137	0,0200	0,0337
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	0,5436	0,1411	0,4494	8,2195
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9881	0,9992	0,9918	0,2652
Anzahl der Messwerte n:	6	6	6	6

Tabelle 8.7b: Kalibrierung der Estrogene nach SPE-Anreicherung und Derivatisierung mittels GC/MS

Ohne Waschschrift mit MeOH/H₂O (4:6) während der SPE-Anreicherung, ansonsten Bedingungen identisch Tabelle 8.7a.

	<i>d</i>₂-E2	E1	E2	EE2	E3
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche
ng/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert
1,0	723.791	62.632	100.101	24.596	41.170
2,5	552.296	45.503	163.344	57.543	50.754
5,0	509.960	182.096	276.513	146.758	75.249
7,5	320.054	176.367	256.578	131.703	53.686
10,0	777.104	546.512	817.918	422.312	186.982
12,5	359.563	336.044	449.058	202.502	89.837

Konz.	E1/<i>d</i>₂-E2	E2/<i>d</i>₂-E2	EE2/<i>d</i>₂-E2	E3/<i>d</i>₂-E2
ng/l	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
1,0	0,0865	0,1383	0,0340	0,0569
2,5	0,0824	0,2958	0,1042	0,0919
5,0	0,3571	0,5422	0,2878	0,1476
7,5	0,5511	0,8017	0,4115	0,1677
10,0	0,7033	1,0525	0,5434	0,2406
12,5	0,9346	1,2489	0,6523	0,2499

LINEARER AUSGLEICH	E1/<i>d</i>₂-E2	E2/<i>d</i>₂-E2	EE2/<i>d</i>₂-E2	E3/<i>d</i>₂-E2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0404	0,0520	-0,0132	0,0483
Steigung m:	0,0768	0,0979	0,0549	0,0173
Reststandardabweichung <i>s_y</i>:	0,0462	0,0197	0,0213	0,0153
Verfahrensstandardabw. <i>s_{x0}</i>:	0,6016	0,2012	0,388	0,8844
Bestimmtheitsmaß <i>R</i>²:	0,9854	0,9983	0,9939	0,9689
Anzahl der Messwerte n:	6	6	6	6

Tabelle 8.8: Bestimmung der Variationskoeffizienten nach SPE-GC/MSE1/E2/EE2/E3: 10ng/l; d_2 -E2: 10ng/l; n=3Ohne Waschschrift mit MeOH/H₂O (4:6) während der SPE-Anreicherung, ansonsten Bedingungen identisch Tabelle 8.7a.

10ng/l_10ng/l	E1/d_2-E2	E2/d_2-E2	EE2/d_2-E2	E3/d_2-E2
1	0,7602	1,0313	0,4118	0,3130
2	0,7875	1,0808	0,4519	0,3653
3	0,7033	1,0525	0,5434	0,2406
Mw	0,7503	1,0549	0,4691	0,3063
Stabw	0,0430	0,0248	0,0675	0,0626
Vk	5,73%	2,35%	14,38%	20,44%

8.1.7 SPME – OPTIMIERUNG DER PARAMETER

Tabelle 8.9: Variation der Anreicherungstemperatur

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: Temperatur variabel, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Anr. temp.	Fläche	Fläche	Fläche
°C	Zählwert	Zählwert	Zählwert
30	118.395	99.718	129.528
30	91.321	84.088	106.044
30	125.260	102.085	146.850
40	143.389	130.054	176.760
40	141.224	114.086	181.595
40	140.945	119.552	170.797
50	141.513	135.044	184.844
50	128.983	123.240	163.018
50	151.027	135.341	191.624
60	137.361	132.455	171.694
60	143.605	128.724	195.019
60	153.988	143.083	202.624
70	106.402	107.801	142.210
70	139.944	131.834	162.435
70	145.842	130.452	175.337
80	93.640	97.531	142.169
80	134.579	124.592	165.125
80	108.665	102.785	147.463

Anr. temp.	E1	E2	EE2
°C	Mw	Mw	Mw
30	111.659	95.297	127.474
40	141.853	121.231	176.384
50	140.508	131.208	179.829
60	144.985	134.754	189.779
70	130.729	123.362	159.994
80	112.295	108.303	151.586

Tabelle 8.10a: Variation der Anreicherungszeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, Zeit variabel,
1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Anr. zeit	Fläche	Fläche	Fläche
min	Zählwert	Zählwert	Zählwert
5	35.324	27.503	45.378
5	35.360	29.418	46.503
5	32.714	25.901	42.853
10	49.463	39.170	62.048
10	56.641	47.256	82.907
10	38.357	31.704	54.212
15	71.790	58.394	98.116
15	73.208	60.943	106.909
15	64.968	54.592	93.543
30	98.450	80.794	136.286
30	109.210	92.278	166.450
30	100.911	85.781	157.879
60	166.136	138.874	244.008
60	119.020	101.308	176.522
60	154.903	132.196	241.782
90	202.892	170.516	308.357
90	191.650	163.614	290.698
90	184.806	157.794	295.584
120	230.470	196.392	370.615
120	211.259	182.864	328.842
120	250.919	199.873	360.638
150	309.049	250.514	480.951
150	248.616	212.138	393.925
150	280.374	214.561	369.508

Anr. zeit	E1	E2	EE2
min	Mw	Mw	Mw
5	34.466	27.607	44.911
10	48.154	39.377	66.389
15	69.989	57.976	99.523
30	102.857	86.284	153.538
60	146.686	124.126	220.771
90	193.116	163.975	298.213
120	230.883	193.043	353.365
150	279.346	225.738	414.795

Tabelle 8.10b: Variation der Anreicherungszeit

1mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, Zeit variabel, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=1

	E1	E2	EE2
Anr. zeit	Fläche	Fläche	Fläche
min	Zählwert	Zählwert	Zählwert
5	71.897	54.720	68.043
10	108.758	83.727	117.504
15	161.394	122.677	169.741
20	159.107	125.606	187.896
30	174.645	146.540	238.172
60	284.416	236.340	389.115
90	312.896	260.350	438.140
120	427.030	333.728	585.230
180	447.643	350.455	636.508
240	479.700	371.796	679.629

Tabelle 8.11: Variation der Rührgeschwindigkeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, Rührgeschwindigkeit variabel, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Rührgeschw.	Fläche	Fläche	Fläche
U/min	Zählwert	Zählwert	Zählwert
0	7.047	6.111	6.435
0	6.788	5.765	6.247
0	6.560	5.542	5.797
200	44.412	37.445	38.833
200	40.281	34.067	33.847
200	54.656	46.088	48.522
400	82.477	68.141	82.281
400	64.563	55.640	66.293
400	65.905	56.746	65.651
600	68.425	59.374	71.683
600	87.587	73.808	99.709
600	83.090	71.924	93.319
800	90.605	80.513	104.146
800	83.085	72.353	93.009
800	96.571	86.368	111.297
1000	97.775	84.219	118.929
1000	95.468	79.438	118.849
1000	112.499	92.990	143.447

Rührgeschw.	E1	E2	EE2
U/min	Mw	Mw	Mw
0	6.798	5.806	6.160
200	46.450	39.200	40.401
400	70.982	60.176	71.408
600	79.701	68.369	88.237
800	90.087	79.745	102.817
1000	101.914	85.549	127.075

Tabelle 8.12: Variation des Anreicherungsvolumens

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, Volumen variabel; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Volumen	Fläche	Fläche	Fläche
ml	Zählwert	Zählwert	Zählwert
3	51.534	44.737	68.968
3	59.280	49.751	91.200
3	53.211	44.524	70.715
10	48.022	41.156	70.884
10	54.843	45.430	78.655
10	54.063	46.233	82.714
20	58.628	49.351	92.158
20	75.546	63.764	107.012
20	54.773	47.321	86.895
50	64.674	56.458	100.271
50	45.148	38.407	64.080
50	57.432	49.145	88.506

Volumen	E1	E2	EE2
ml	Mw	Mw	Mw
3	54.675	46.337	76.961
10	52.309	44.273	77.418
20	62.982	53.479	95.355
50	55.751	48.003	84.286

Tabelle 8.13: Variation des pH-Wertes

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., pH variabel, 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
pH	Fläche	Fläche	Fläche
	Zählwert	Zählwert	Zählwert
2	33.415	31.428	56.328
2	28.407	26.457	42.641
2	32.490	30.606	53.824
4	33.663	31.436	55.586
4	28.971	27.160	42.521
4	32.698	30.586	53.717
6	30.758	28.420	48.623
6	29.335	27.393	43.408
6	31.273	29.535	52.509
8	31.817	29.676	51.476
8	32.627	30.333	57.736
8	27.357	25.950	39.236
10	29.847	28.117	47.936
10	30.765	28.489	49.450
10	35.272	33.599	56.109
12	1.819	1.422	5.234
12	1.926	1.438	5.261
12	2.052	1.697	6.327

pH	E1	E2	EE2
	Mw	Mw	Mw
2	31.437	29.497	50.931
4	31.777	29.727	50.608
6	30.455	28.449	48.180
8	30.600	28.653	49.483
10	31.961	30.068	51.165
12	1.932	1.519	5.607

Tabelle 8.14: Variation des Methanolgehaltes

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., Methanolgehalt variabel; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
MeOH	Fläche	Fläche	Fläche
% (V/V)	Zählwert	Zählwert	Zählwert
1	69.525	54.947	81.710
1	81.878	65.579	103.407
1	71.899	57.542	91.479
2	79.224	63.393	99.197
2	82.572	66.159	107.873
2	71.611	57.892	85.014
5	65.788	54.543	87.811
5	68.265	55.692	88.919
5	68.359	55.263	85.912
10	52.961	43.495	69.252
10	46.984	38.528	56.449
10	39.526	32.239	52.392
15	41.619	34.061	56.211
15	41.423	34.265	56.665
15	52.029	41.918	67.302

MeOH	E1	E2	EE2
% (V/V)	Mw	Mw	Mw
1	74.434	59.356	92.199
2	77.802	62.481	97.361
5	67.471	55.166	87.547
10	46.490	38.087	59.364
15	45.024	36.748	60.059

Tabelle 8.15: Variation des Salzgehaltes

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol, Salzgehalt variabel; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorption: 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=1

	E1	E2	EE2
Salz	Fläche	Fläche	Fläche
% (m/V)	Zählwert	Zählwert	Zählwert
0	39.939	30.687	43.880
1	63.241	48.256	78.105
5	88.397	60.314	79.154
10	135.715	73.511	46.505
20	192.554	103.830	36.596
33	142.361	70.953	2.574
0	90.760	33.442	-
1	79.097	30.765	1.464
0	75.146	29.794	1.864

Tabelle 8.16: Variation der Desorptionstemperatur

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; Desorptionstemperatur variabel, 5 min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Des. temp.	Fläche	Fläche	Fläche
°C	Zählwert	Zählwert	Zählwert
280	82.863	68.008	98.100
280	90.995	69.843	112.709
280	67.342	49.438	70.082
290	112.694	92.852	125.788
290	133.620	111.765	174.129
290	124.983	108.696	124.439
300	133.707	110.905	162.522
300	133.835	110.513	171.503
300	125.764	102.012	132.557
310	117.600	97.490	130.659
310	130.436	106.782	162.443
310	113.406	87.256	124.975
320	136.692	111.619	164.107
320	139.501	112.305	178.090
320	129.080	104.624	146.016

Des. temp.	E1	E2	EE2
°C	Mw	Mw	Mw
280	80.400	62.430	93.630
290	123.766	104.438	141.452
300	131.102	107.810	155.527
310	120.481	97.176	139.359
320	135.091	109.516	162.738

Tabelle 8.17: Variation der Desorptionszeit

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml; 280°C, Desorptionszeit variabel, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=3

	E1	E2	EE2
Des. zeit	Fläche	Fläche	Fläche
min	Zählwert	Zählwert	Zählwert
1	20.985	18.235	25.467
1	14.305	12.071	16.605
1	16.226	13.666	17.881
2	50.804	43.421	63.575
2	60.885	51.061	76.111
2	69.008	57.408	86.323
3	94.471	82.238	119.916
3	92.795	79.882	122.561
3	79.286	64.630	89.846
4	104.938	91.690	131.033
4	102.223	86.584	129.707
4	117.465	94.665	146.485
5	94.424	81.173	120.381
5	114.697	96.621	148.343
5	114.281	94.061	137.977

Des. zeit	E1	E2	EE2
min	Mw	Mw	Mw
1	17.172	14.657	19.984
2	60.232	50.630	75.336
3	88.851	75.583	110.774
4	108.209	90.980	135.742
5	107.801	90.618	135.567

Tabelle 8.18: Bestimmung der Variationskoeffizienten (500 ppb E1/E2/EE2)

0,5mg/l E1/E2/EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min,
1000 U/min, 3ml; 280°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=6

Standard- bedingungen	E1	E2	EE2
	Fläche	Fläche	Fläche
	Zählwert	Zählwert	Zählwert
	97.775	84.219	118.929
	95.468	79.438	118.849
	112.499	92.990	143.447
	94.424	81.173	120.381
	114.697	96.621	148.343
	114.281	94.061	137.977
Mw	104.857	88.084	131.321
Stabw	9.912	7.350	13.490
Vk	9,45%	8,34%	10,27%

Tabelle 8.19: Zersetzung von Ethinylestradiol während der Desorption im Liner

0,5mg/l EE2 in Aqua bidest., 1% (V/V) Methanol; Anreicherung: 40°C, 15min, 1000 U/min, 3ml;
Desorption bei 280°C bzw. 300°C, 5min, Standardbedingungen: SPME-GC/FID; n=6

280°C	E1	E2	E1/E2
	Fläche	Fläche	Fläche
	Zählwert	Zählwert	Zählwert
	57.078	914	1,60%
	53.204	779	1,46%
	50.233	746	1,49%
	52.785	367	0,70%
	49.680	422	0,85%
	56.104	729	1,30%

300°C	E1	E2	E1/E2
	Fläche	Fläche	Fläche
	Zählwert	Zählwert	Zählwert
	55.173	1.185	2,15%
	58.147	570	0,98%
	54.176	633	1,17%
	58.264	666	1,14%
	57.402	660	1,15%
	56.218	1.160	2,06%

8.1.8 SPME – KALIBRIERUNG OHNE DERIVATISIERUNG

Tabelle 8.20: Kalibrierung der Estrogene mittels SPME im Konzentrationsbereich von 1-10 µg/l, GC/MS

IS: Estradiol- d_2 , 2µg/l; Anreicherung: 3ml, 60°C, 30min, Rührer 10, manuell; n=2; GC/MS (SIM: Messung jeweils zweier charakteristischer Ionen)

	d_2 -E2	E1	E2	$E1/d_2$ -E2	$E2/d_2$ -E2
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
µg/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert		
1,0	25.189	23.037	17.336	0,9146	0,6882
1,0	93.657	85.205	91.559	0,9098	0,9776
1,0	23.651	18.996	24.404	0,8032	1,0318
2,5	38.211	72.091	82.431	1,8867	2,1573
2,5	36.671	55.094	76.707	1,5024	2,0918
5,0	44.091	137.632	195.864	3,1215	4,4423
5,0	50.411	150.152	223.363	2,9786	4,4308
7,5	60.369	258.495	386.055	4,2819	6,3949
7,5	53.700	237.411	347.153	4,4211	6,4647
10,0	65.771	354.034	505.447	5,3828	7,6850
10,0	72.396	410.688	582.530	5,6728	8,0464

Konz.	$E1/d_2$ -E2	$E2/d_2$ -E2
µg/l	Mw	Mw
1,0	0,8758	0,8992
2,5	1,6945	2,1245
5,0	3,0501	4,4366
7,5	4,3515	6,4298
10,0	5,5278	7,8657

LINEARER AUSGLEICH:	$E1/d_2$ -E2	$E2/d_2$ -E2
Ordinatenabschnitt b:	0,3892	0,2080
Steigung m:	0,5206	0,7948
Reststandardabweichung s_y:	0,1373	0,2613
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	0,2632	0,3288
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9949	0,9921
Anzahl der Messwerte n:	11	11

Tabelle 8.21: Bestimmung der Variationskoeffizienten für 10 ppb E1,E2 / 2 ppb d_2 -E2

Bedingungen: siehe Tabelle 8.20; n=6

10µg/l_2µg/l	E1	E2	d_2 -E2	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2
	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/Fläche	Fläche/Fläche
	Zählwert	Zählwert	Zählwert		
1	189.836	246.384	28.903	6,5680	8,5245
2	202.476	246.183	30.930	6,5463	7,9594
3	189.467	239.563	26.501	7,1494	9,0398
4	200.205	240.753	28.070	7,1323	8,5769
5	181.372	218.104	25.281	7,1742	8,6272
6	214.734	255.774	29.747	7,2187	8,5983
Mw	196.348	241.127	28.239	6,9648	8,5543
Stabw	11870,20	12652,10	2085,92	0,3172	0,3459
Vk	6,05%	5,25%	7,39%	4,55%	4,04%

8.1.9 SPME – KALIBRIERUNG NACH DERIVATISIERUNG

Tabelle 8.22a-c: Kalibrierung der Estrogene im Konzentrationsbereich von 10-100 ng/l mittels SPME-GC/MS und Derivatisierung – Messung an drei verschiedenen Tagen

IS: Estradiol- d_2 , 50ng/l; Anreicherung: 3ml, 60°C, 30min, Rührer 10, 10min Trocknen bei 100°C, Headspace-Derivatisierung: MSTFA (1% TMSIM), 80°C, 30min; manuell; n=1; GC/MS (SIM)

1. Tag: siehe auch Abb. 3.42a-c

	d_2 -E2	E1	E2	EE2	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche
ng/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert			
10	25.924	6.336	5.201	1.087	0,2444	0,2006	0,0419
25	14.837	5.685	7.970	4.143	0,3832	0,5372	0,2792
50	30.831	28.011	28.321	10.756	0,9085	0,9186	0,3489
75	31.139	40.470	40.973	14.971	1,2997	1,3158	0,4808
100	30.532	51.386	55.139	24.413	1,6830	1,8059	0,7996

LINEARER AUSGLEICH:	E1	E2	EE2
Ordinatenabschnitt b:	0,0428	0,0563	0,0053
Steigung m:	0,0166	0,0173	0,0074
Reststandardabweichung s_y:	0,0536	0,0408	0,0802
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	3,2289	2,3584	10,8378
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9941	0,9969	0,9380
Anzahl der Messwerte n:	5	5	5

2. Tag:

	d_2 -E2	E1	E2	EE2	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche
ng/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert			
10	19.244	2.184	5.987	1.334	0,1135	0,3111	0,0693
25	18.891	6.568	9.299	2.740	0,3477	0,4922	0,1450
50	18.831	16.223	17.802	6.573	0,8615	0,9454	0,3491
75	21.376	25.648	25.203	13.362	1,1999	1,1790	0,6251
100	25.806	40.934	37.952	18.732	1,5862	1,4707	0,7259

LINEARER AUSGLEICH:	E1	E2	EE2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0354	0,2020	-0,0239
Steigung m:	0,0165	0,0130	0,0078
Reststandardabweichung s_y:	0,0487	0,0614	0,0455
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	2,9515	4,7231	5,8333
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9951	0,9876	0,9813
Anzahl der Messwerte n:	5	5	5

3. Tag:

	d_2 -E2	E1	E2	EE2	E1/ d_2 -E2	E2/ d_2 -E2	EE2/ d_2 -E2
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche	Fläche/ Fläche
ng/l	Zählwert	Zählwert	Zählwert	Zählwert			
10	7.360	2.032	1.336	-	0,2761	0,1815	-
25	5.563	4.044	2.661	1.094	0,7269	0,4783	0,1967
50	5.963	4.418	4.511	1.484	0,7409	0,7565	0,2489
75	5.526	5.898	6.245	1.736	1,0673	1,1301	0,3142
100	5.092	8.442	8.685	2.759	1,6579	1,7056	0,5418

LINEARER AUSGLEICH:	E1	E2	EE2
Ordinatenabschnitt b:	0,1970	0,0132	-0,0073
Steigung m:	0,0134	0,0161	0,0051
Reststandardabweichung s_y:	0,1729	0,0871	0,0658
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	12,903	5,4099	12,902
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9143	0,9838	0,9158
Anzahl der Messwerte n:	5	5	5

8.1.10 SPME – VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN

Tabelle 8.22: Externe Kalibrierung der Estrogene im Konzentrationsbereich von 0,025-0,30 µg/µl zur Bestimmung der K_{fs} -Werte, GC/FID
manuelle Injektion von 1µl, n=4; GC/FID

	E1	E2	EE2		E1	E2	EE2
Konz.	Fläche	Fläche	Fläche	Konz.	Fläche	Fläche	Fläche
µg/µl	Zählwert	Zählwert	Zählwert	µg/µl	Zählwert	Zählwert	Zählwert
0,025	8.859	7.830	8.223	0,25	78.480	72.490	76.534
0,025	8.568	7.217	7.547	0,25	88.610	80.886	83.623
0,025	7.005	5.906	6.189	0,25	85.989	79.048	84.041
0,025	7.472	6.385	6.555	0,25	88.381	80.475	83.686
0,05	15.485	13.668	14.382	0,30	102.123	94.337	99.832
0,05	18.729	16.397	17.074	0,30	92.009	84.337	88.630
0,05	19.284	16.372	16.475	0,30	94.879	85.651	86.891
0,05	17.095	14.891	15.155	0,30	104.393	95.126	98.500
0,10	32.066	28.674	30.129				
0,10	32.614	28.592	29.310				
0,10	37.331	31.445	31.915				
0,10	32.524	28.748	29.478				
0,15	49.882	45.495	48.678				
0,15	48.907	44.549	46.990				
0,15	45.115	41.356	43.619				
0,15	49.837	45.549	48.578				
0,20	56.185	51.420	54.978				
0,20	62.554	57.339	60.739				
0,20	57.595	51.344	52.606				
0,20	55.867	49.733	51.256				

Konz.	E1			E2			EE2		
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk	Mw	Stabw	Vk
0,025	7.976	881	11,04%	6.835	857	12,53%	7.129	928	13,02%
0,05	17.648	1.716	9,72%	15.332	1.314	8,57%	15.772	1.225	7,77%
0,10	33.634	2.476	7,36%	29.365	1.388	4,73%	30.208	1.192	3,94%
0,15	48.435	2.259	4,66%	44.237	1.975	4,46%	46.966	2.362	5,03%
0,20	58.050	3.095	5,33%	52.459	3.345	6,38%	54.895	4.189	7,63%
0,25	85.365	4.741	5,55%	78.225	3.903	4,99%	81.971	3.629	4,43%
0,30	98.351	5.860	5,96%	89.863	5.657	6,29%	93.463	6.645	7,11%

LINEARER AUSGLEICH:	E1	E2	EE2
Ordinatenabschnitt b:	-20,8	-953,4	-1.044,1
Steigung m:	325.214	300.455	314.150
Reststandardabweichung s_y:	4.478	4.176	4.522
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	0,0138	0,0139	0,0144
Bestimmtheitsmaß R^2:	0,9808	0,9995	0,9791
Anzahl der Messwerte n:	28	28	28

Tabelle 8.23 a-f: Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Spalte 1: Anreicherungsvolumen

Spalte 2: im jeweiligen Anreicherungsvolumen enthaltene Masse des Estrogens

Spalte 3: molare Ausgangskonzentration des Estrogens in der Anreicherungslösung (c_o)

Spalte 4: nach 22h Anreicherung mittels GC/FID ermittelter Flächenwert

Spalte 5: aus dem Flächenwert über die Kalibrierung berechnete angereicherte Masse

Spalte 6: Anteil der angereicherten Masse an der in der Lösung enthaltenen Gesamtmasse

Spalte 7: an der Faser angereicherte Stoffmenge

Spalte 8: unter Verwendung von Gleichung (10) berechneter Verteilungskoeffizient (K_{fs})

Das Faservolumen wurde mit $0,521\mu\text{l}$ der Literatur entnommen [SCHEPPERS WERCINSKI, 1999].

E1: Faser A

V [ml]	Gesamt $[\mu\text{g}]$	c_o [mol/ml]	Fläche	Faser $[\mu\text{g}]$	Faser/ Gesamt	Faser [mol]	K_{fs}
1,5	0,075	1,849E-10	22.920	0,0705	94,1%	2,609E-10	45.542
3	0,15	1,849E-10	32.235	0,0992	66,1%	3,668E-10	11.239
5	0,25	1,849E-10	39.705	0,1222	48,9%	4,517E-10	9.169
10	0,50	1,849E-10	48.359	0,1488	29,8%	5,502E-10	8.129
20	1,00	1,849E-10	53.785	0,1654	16,5%	6,119E-10	7.610
50	2,50	1,849E-10	54.595	0,1679	6,7%	6,211E-10	6.911

E1: Faser B

V [ml]	Gesamt [µg]	c ₀ [mol/ml]	Fläche	Faser [µg]	Faser/Gesamt	Faser [mol]	K _{fs}
3	0,15	1,849E-10	16.936	0,0521	34,8%	1,928E-10	3.068
5	0,25	1,849E-10	19.691	0,0606	24,2%	2,242E-10	3.071
10	0,50	1,849E-10	23.140	0,0712	14,2%	2,634E-10	3.188
20	1,00	1,849E-10	23.640	0,0728	7,3%	2,691E-10	3.012
50	2,50	1,849E-10	27.546	0,0848	3,4%	3,135E-10	3.368
100	5,00	1,849E-10	27.207	0,0837	1,7%	3,096E-10	3.269

E2: Faser A

V [ml]	Gesamt [µg]	c ₀ [mol/ml]	Fläche	Faser [µg]	Faser/Gesamt	Faser [mol]	K _{fs}
1,5	0,075	1,836E-10	18.321	0,0642	85,5%	2,355E-10	17.024
3	0,15	1,836E-10	26.227	0,0905	60,3%	3,321E-10	8.749
5	0,25	1,836E-10	31.311	0,1074	43,0%	3,942E-10	7.226
10	0,50	1,836E-10	41.007	0,1397	27,9%	5,127E-10	7.439
20	1,00	1,836E-10	45.118	0,1533	15,3%	5,629E-10	6.952
50	2,50	1,836E-10	46.146	0,1568	6,3%	5,755E-10	6.420

E2: Faser B

V [ml]	Gesamt [µg]	c ₀ [mol/ml]	Fläche	Faser [µg]	Faser/Gesamt	Faser [mol]	K _{fs}
3	0,15	1,836E-10	14.752	0,0523	34,8%	1,919E-10	3.080
5	0,25	1,836E-10	18.523	0,0648	25,9%	2,380E-10	3.360
10	0,50	1,836E-10	20.705	0,0721	14,4%	2,646E-10	3.233
20	1,00	1,836E-10	22.412	0,0778	7,8%	2,855E-10	3.237
50	2,50	1,836E-10	23.563	0,0816	3,3%	2,996E-10	3.238
100	5,00	1,836E-10	24.653	0,0852	1,7%	3,129E-10	3.328

EE2: Faser A

V [ml]	Gesamt [µg]	c ₀ [mol/ml]	Fläche	Faser [µg]	Faser/Gesamt	Faser [mol]	K _{fs}
1,5	0,075	1,687E-10	25.677	0,0851	113,4%	2,870E-10	-
3	0,15	1,687E-10	44.324	0,1444	96,3%	4,872E-10	148.895
5	0,25	1,687E-10	60.065	0,1945	77,8%	6,563E-10	33.649
10	0,50	1,687E-10	104.555	0,3361	67,2%	1,134E-09	39.375
20	1,00	1,687E-10	134.832	0,4325	43,3%	1,459E-09	29.258
50	2,50	1,687E-10	144.416	0,4630	18,5%	1,562E-09	21.815

EE2: Faser B

V [ml]	Gesamt [µg]	c ₀ [mol/ml]	Fläche	Faser [µg]	Faser/Gesamt	Faser [mol]	K _{fs}
3	0,15	1,687E-10	25.907	0,0858	57,2%	2,894E-10	7.693
5	0,25	1,687E-10	37.043	0,1212	48,5%	4,090E-10	9.036
10	0,50	1,687E-10	52.429	0,1702	34,0%	5,743E-10	9.907
20	1,00	1,687E-10	47.601	0,1548	15,5%	5,224E-10	7.033
50	2,50	1,687E-10	56.732	0,1839	7,4%	6,205E-10	7.621
100	5,00	1,687E-10	61.822	0,2001	4,0%	6,752E-10	8.002

8.1.11 REALPROBEN

Kalibrierung SPE-GC/MS:

LINEARER AUSGLEICH	E1/d₂-E2	E2/d₂-E2	EE2/d₂-E2	E3/d₂-E2
Ordinatenabschnitt b:	-0,0158	0,0448	0,0275	-0,0138
Steigung m:	0,0626	0,0851	0,0314	0,0234
Reststandardabweichung s_y:	0,0077	0,0174	0,0080	0,0155
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	0,1230	0,2045	0,2548	0,6624
Bestimmtheitsmaß R²:	0,9992	0,9977	0,9963	0,9759
Anzahl der Messwerte n:	7	7	7	7

Abwasserproben	E1/d ₂ -E2 Fläche/Fläche	E1 ng/l
10.02.02_1	0,9106	14,80
10.02.02_2	0,9815	15,93
02.03.02_1	1,2702	20,54
02.03.02_2	1,2486	20,20
06.03.02_1	1,2740	20,60
06.03.02_2	1,3599	21,98

Kalibrierung SPME-GC/MS:

LINEARER AUSGLEICH	E1/d₂-E2	E2/d₂-E2	EE2/d₂-E2
Ordinatenabschnitt b:	0,1445	0,2784	0,1230
Steigung m:	0,0109	0,0148	0,0087
Reststandardabweichung s_y:	0,0223	0,0917	0,0216
Verfahrensstandardabw. s_{x0}:	2,0459	6,1959	2,4828
Bestimmtheitsmaß R²:	0,9977	0,9788	0,9965
Anzahl der Messwerte n:	5	5	5

Abwasserproben	E1/d ₂ -E2	E1
	Fläche/Fläche	ng/l
10.02.02	0,2490	9,56
02.03.02	0,3349	17,43
06.03.02	0,2959	13,85

8.2 MASSENSPEKTREN

8.2.1 ESTROGENE – OHNE DERIVATISIERUNG

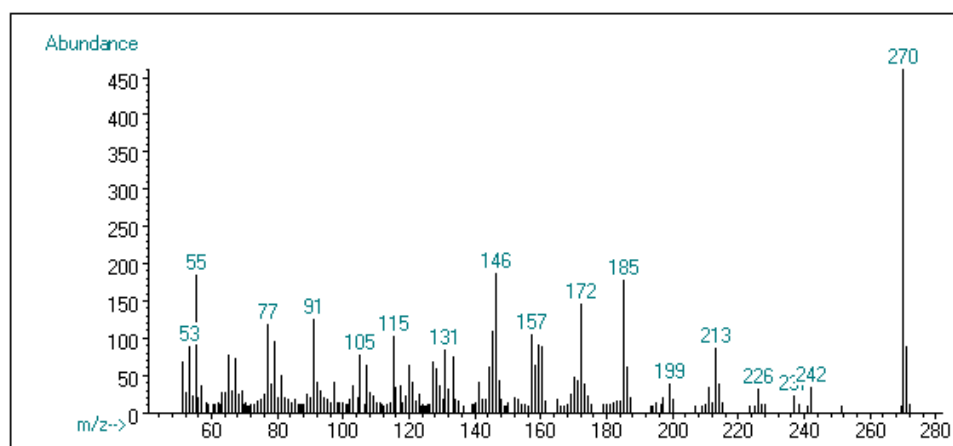


Abbildung 8.1: Estron, E1 ($M_r = 270$)

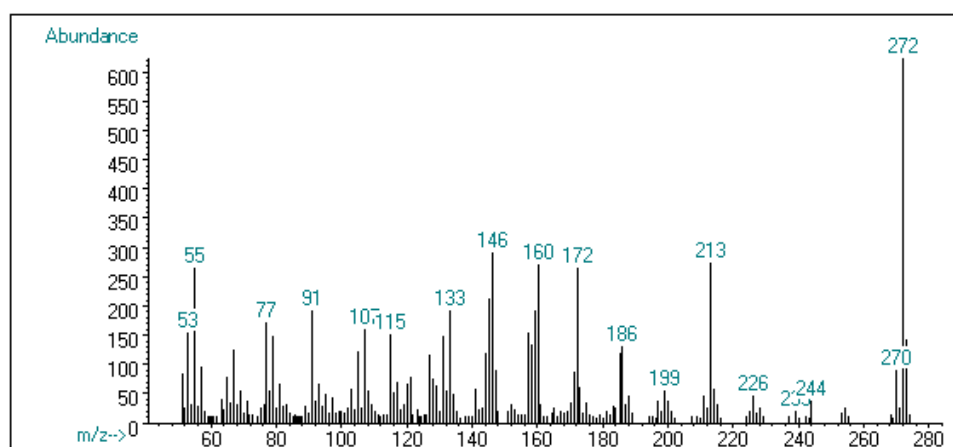


Abbildung 8.2: Estradiol, E2 ($M_r = 272$)

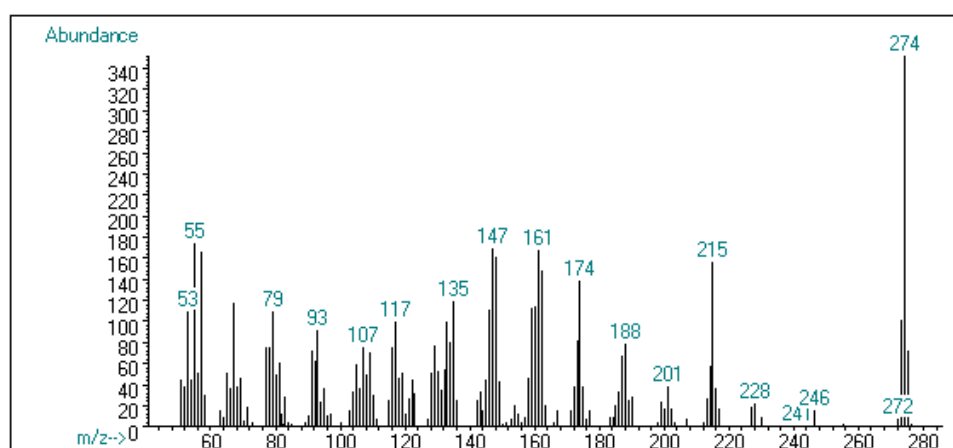


Abbildung 8.3: Estradiol- d_2 , d_2 -E2 ($M_r = 274$)

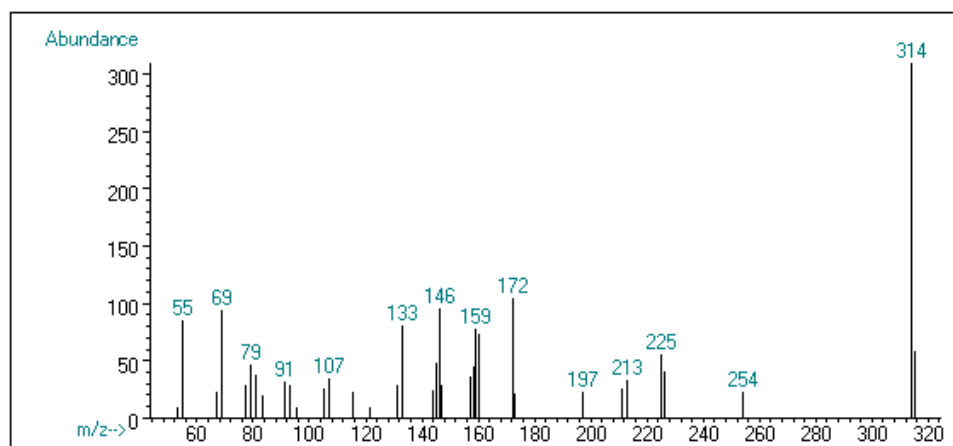


Abbildung 8.4: Estradiol-17-acetat, E2-17ac ($M_r = 314$)

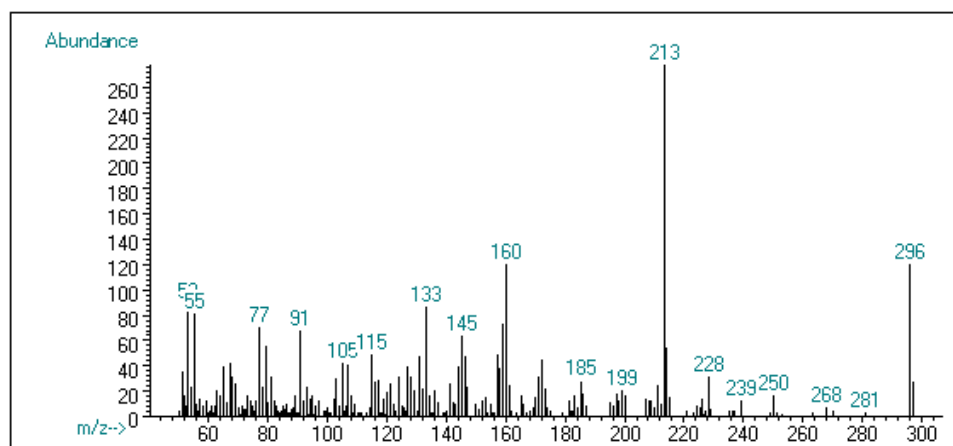
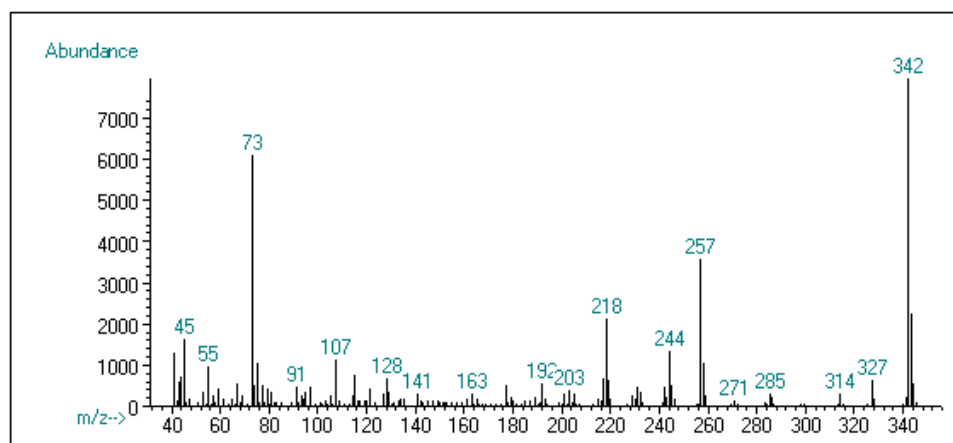
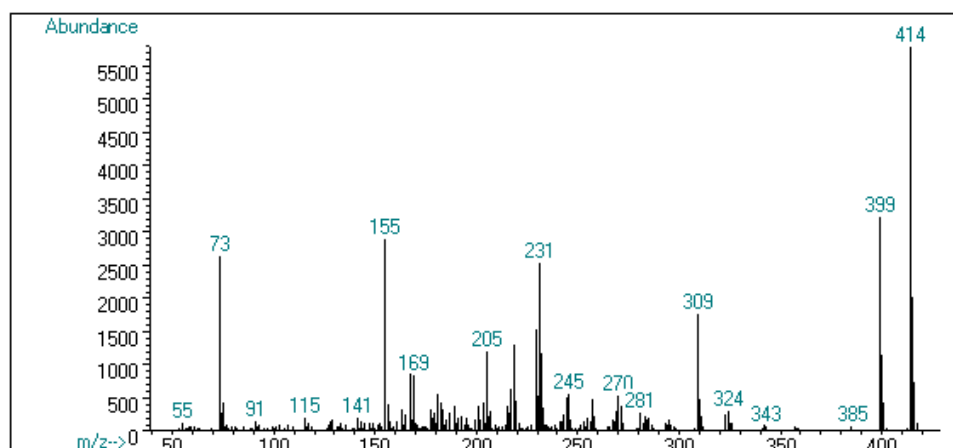
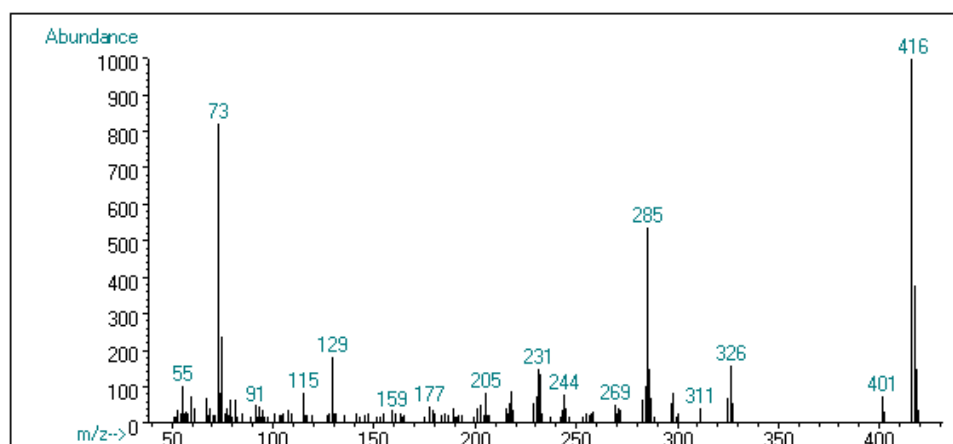


Abbildung 8.5: Ethinylestradiol, EE2 ($M_r = 296$)

8.2.2 ESTROGENE – NACH DERIVATISIERUNG

Abbildung 8.6: E1-TMS(1) ($M_r = 342$)Abbildung 8.7: E1-TMS(2) ($M_r = 414$)Abbildung 8.8: E2-TMS(2) ($M_r = 416$)

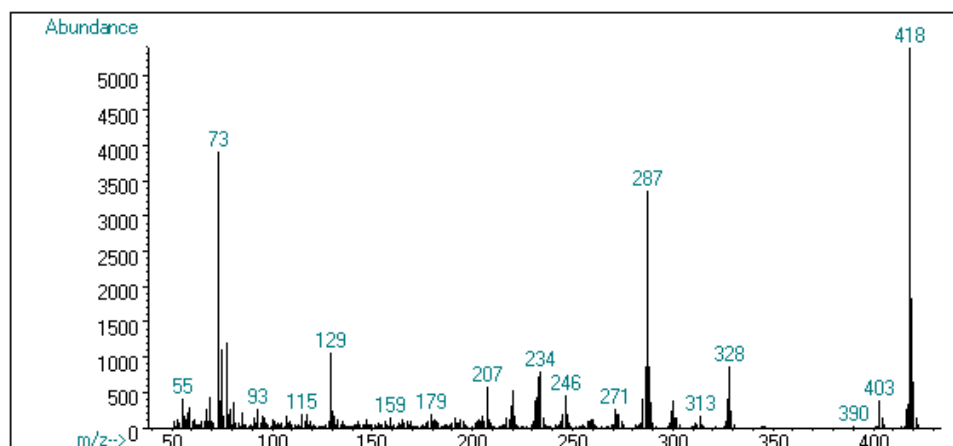


Abbildung 8.9: d_2 -E2-TMS(2) ($M_r = 418$)

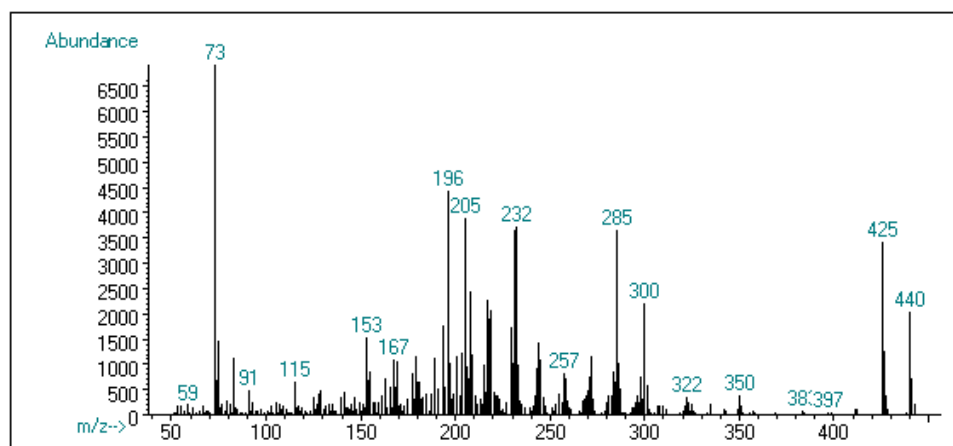


Abbildung 8.10: EE2-TMS(2) ($M_r = 440$)

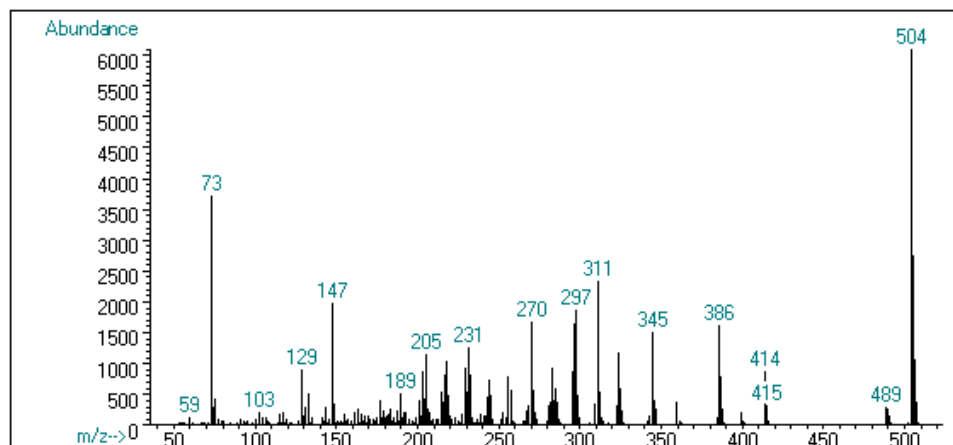


Abbildung 8.11: E3-TMS(3) ($M_r = 504$)

LITERATURVERZEICHNIS

AHRER, 2001

W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger

Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry

Journal of Chromatography A, **910**, 69-78 (2001)

AI, 1997

J. Ai

Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations

Analytical Chemistry, **69**, 1230-1236 (1997)

ARTHUR, 1990

C.L. Arthur, J. Pawliszyn

Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers

Analytical Chemistry, **62**, 2145-2148 (1990)

ARTHUR, 1992

C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, J.R. Berg

Automation and optimization of solid-phase microextraction

Analytical Chemistry, **64**, 1960-1966 (1992)

AUGUSTO, 2000

F. Augusto, A.L.P. Valente, E. Dos Santos Tada, S.R. Rivellino

Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry

Journal of Chromatography A, **873**, 117-127 (2000)

BARONTI, 2000

C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi

Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water

Environmental Science and Technology, **34 (24)**, 5059-5066 (2000)

BELARDI, 1989

R.G. Belardi, J. Pawliszyn

The application of chemically modified fused silica fibres in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column

Water Pollution Research Journal of Canada, **24**, 179-191 (1989)

BELTRAN, 2000

J. Beltran, F.J. Lopez, F. Hernandez

Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis

Journal of Chromatography A, **885**, 389-404 (2000)

BISCHOFF

Fa. Bischoff, Leonberg

Persönliche Mitteilung von Frau Dipl.-Ing. Julia Räder, Fa. Bischoff vom 10.09.1999

BLAU, 1993

K. Blau, J.M. Halket

Handbook of derivatives for chromatography

Second edition

John Wiley & Sons, New York/Chichester/Brisbane/Toronto/Singapore (1993)

BOND, 1982

A.M. Bond, I.D. Heritage, M.H. Briggs

A new polarographic response for ethynyloestradiol and its application to electrochemical detection associated with reverse-phase liquid chromatography and in cathodic stripping voltammetry

Analytica Chimica Acta, **138**, 35-45 (1982)

BOND, 1984

A.M. Bond, I.D. Heritage, M.H. Briggs

Normal pulse cathodic stripping voltammetry of ethynyloestradiol

Analytical Chemistry, **56**, 1222-1226 (1984)

BUCHHOLZ, 1994

K. Buchholz, J. Pawliszyn

Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols
Analytical Chemistry, **66**, 160-167 (1994)

BUTZ, 1994

S. Butz, T. Heberer, H.-J. Stan

Determination of phenoxyalkanoic acids and other acidic herbicides at the low ppt level
in water applying solid-phase extraction with RP-C₁₈ material
Journal of Chromatography A, **677**, 63-74 (1994)

CHEN, 1995

J. Chen, J. Pawliszyn

Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography
Analytical Chemistry, **67**, 2530-2533 (1995)

COATS, 1976

J.J.R. Coats, R.L. Metcalf, P.-Y. Lu, D.D. Brown, J.F. Williams, L.G. Hansen

Model ecosystem evaluation of the environmental impacts of the veterinary drugs
phenothiazine, sulfamethazine, clopidol, and diethylstilbestrol
Environmental Health Perspectives, **18**, 167-179 (1976)

CRC, 1991

CRC Handbook of Chemistry and Physics

D.R. Lide (Editor)

CRC Press, Boca Raton/Ann Arbor/Boston, 72nd Edition (1991-1992)

CROLEY, 2000

T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March

Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment
Rapid Communications in Mass Spectrometry, **14**, 1087-1093 (2000)

DEAN, 1996

J.R. Dean, W.R. Tomlinson, V. Makovskaya, R. Cumming, M. Hetheridge, M. Comber
Solid-phase microextraction as a method for estimating the octanol-water partition
coefficient
Analytical Chemistry, **68**, 130-133 (1996)

DEGEN, 2000

G.H. Degen, H.M. Bolt
Endocrine disruptors: update on xenoestrogens
International Archives of Occupational and Environmental Health, **73**, 433-441 (2000)

DESBROW, 1998

C. Desbrow, E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock
Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.
1. Chemical fractionation and in vitro biological screening
Environmental Science and Technology, **32**, 1549-1558 (1998)

DJOZAN, 2001

D. Djozan, Y. Assadi, S.H. Haddadi
Anodized aluminium wire as a solid-phase microextraction fiber
Analytical Chemistry, **73**, 4054-4058 (2001)

DONIKE, 1969

M. Donike
N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe
der silylierten Amide
Journal of Chromatography, **42**, 103-104 (1969)

DONIKE, 1980

M. Donike, J. Zimmermann
Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und tert.-Butyldimethylsilyl-
enoläthern von Ketosteroiden für gas-chromatographische und massenspektrometrische
Untersuchungen
Journal of Chromatography, **202**, 483-486 (1980)

DOONG, 2000

R. Doong, S. Chang

Determination of distribution coefficients of priority polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase microextraction

Analytical Chemistry, **72**, 3647-3652 (2000)

ESA, A

<http://www.esainc.com/theory/coulochem/esaelectrode.html>

ESA, B

http://www.esainc.com/theory/coulochem/esa_coulselectro2.html

FERRARI, 1998

R. Ferrari, T. Nilsson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. Del Carlo, P. Dellavedova, E. Fattore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, S. Morgillo, L. Müller, M. Volante

Inter-laboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/l level in water samples

Journal of Chromatography A, **795**, 371-376 (1998)

FORTH, 1996

W. Forth (Herausgeber), D. Henschler, W. Rummel, K. Starke

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

7., völlig neu bearbeitete Auflage

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin/Oxford (1996)

FOTSIS, 1980

T. Fotsis, P. Järvenpää, H. Adlerkreutz

Purification of urine for quantification of the complete estrogen profile

The Journal of Steroid Biochemistry, **12**, 503-508 (1980)

FOTSIS, 1987

T. Fotsis, H. Adlerkreutz

The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS – I. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates
The Journal of Steroid Biochemistry, **28**, 203-213 (1987)

FUCCI, 2001

N. Fucci, N. De Giovanni, M. Chiarotti, S. Scarlata

SPME-GC analysis of THC in saliva samples collected with „EPITOPE“ device
Forensic Science International, **119**, 318-321 (2001)

GERSTEL, 2000

Gerstel Aktuell, Nr. 24 März 2000

GORECKI, 1997

T. Gorecki, J. Pawliszyn

Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction –
Part 1. Theoretical considerations
The Analyst, **122**, 1079-1086 (1997)

GORECKI, 1998A

T. Gorecki, P. Martos, J. Pawliszyn

Strategies for the analysis of polar solvents in liquid matrixes
Analytical Chemistry, **70**, 19-27 (1998)

GORECKI, 1998B

T. Gorecki, A. Khaled, J. Pawliszyn

The effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction –
Part 2. Experimental verification
The Analyst, **123**, 2819-2824 (1998)

GORECKI, 1999

T. Gorecki, X. Yu, J. Pawliszyn

Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers
The Analyst, **124**, 643-649 (1999)

GREMM, 1993

T. Gremm, S. Huber, F.H. Frimmel

Untersuchung über den Einfluß gelöster Huminstoffe auf die Analytik organischer Schadstoffe

Vom Wasser, **80**, 109-121 (1993)

GUO, 1996

F. Guo, T. Gorecki, D. Irish, J. Pawliszyn

Solid phase microextraction combined with electrochemistry

Analytical Communications, **33**, 361-364 (1996)

HAGER, 1993

Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis

Herausgeber: F. von Bruchhausen

5., vollst. Neubearb. Auflage

Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1993)

HÄNSEL, 1999

R. Hänsel, O. Sticher, E. Steinegger

Pharmakognosie – Phytopharmazie

6. Auflage

Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York/Barcelona/Hongkong/London/

Mailand/Paris/Singapur/Tokio (1999)

HARTIG, 2000

C. Hartig

Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt

Dissertation, Technische Universität Berlin (2000)

HARTMANN, 1998

A. Hartmann, A.C. Alder, T. Koller, R.M. Widmer

Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater

Environmental Toxicology and Chemistry, **17 (3)**, 337-382 (1998)

HEBERER, 1995

T. Heberer, S. Butz, H.-J. Stan

Analysis of phenoxycarboxylic acids and other acidic compounds in tap, ground, surface and sewage water at the low ng/l level

International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, **58**, 43-53 (1995)

HEBERER, 2002

T. Heberer

Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data

Toxicology Letters, **131**, 5-17 (2002)

HELALEH, 2001

M.I.H. Helaleh, S. Fujii, T. Korenga

Column silylation method for determining endocrine disruptors from environmental water samples by solid phase micro-extraction

Talanta, **54**, 1039-1047 (2001)

HENNION, 2000

M.-C. Hennion

Graphitized carbons for solid-phase extraction

Journal of Chromatography A, **885**, 73-95 (2000)

HENRIKSEN, 2001

T. Henriksen, B. Svensmark, B. Lindhardt, R.K. Juhler

Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC-MS

Chemosphere, **44**, 1531-1539 (2001)

HENZE, 1986

G. Henze, R. Neeb

Elektrochemische Analytik

Springer Verlag Berlin (1986)

HIGNITE, 1977

C. Hignite, D.L. Azarnoff

Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent

Life Sciences, **20**, 337-342 (1977)

HIRSCH, 1996

R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz

Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt

Vom Wasser, **87**, 263-274 (1996)

HIRSCH, 1998

R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.-L. Kratz

Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A, **815**, 213-223 (1998)

HIRSCH, 2000

R. Hirsch, T.A. Ternes, A. Lindart, K. Haberer, R.-D. Wilken

A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC-electrospray-tandem-MS detection

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **366**, 835-841 (2000)

HOLTEY-WEBER, 1999A

R.I. Holtey-Weber, H.A. Färber, H.F. Schöler

On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS

Vom Wasser, **92**, 1-9 (1999)

HOLTEY-WEBER, 1999B

R. Holtey-Weber, H. Färber

Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Oberflächenwasser mit on-line-Derivatisierung und GC-MS/MS

GIT Spezial, Separation, **2**, 78-81 (1999)

HOLTEY-WEBER, 2001

R. Holtey-Weber

Multimethode zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser

Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2001)

HORWITZ, 1982

W. Horwitz

Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs

Analytical Chemistry, **54**, 67A-76A (1982)

HUPPERT, 1998

N. Huppert, M. Würtele, H.H. Hahn

Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical

Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME)

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **362**, 529-536 (1998)

HÜTTER, 1994

L.A. Hütter

Wasser und Wasseruntersuchung

6. Auflage

Otto Salle Verlag, Frankfurt; Verlag Sauerländer, Aarau (1994)

ICH-Q2B, 1996

ICH Topic Q2B

Validation of analytical procedures: Methodology

CPMC/ICH/281/95, 6. November 1996

IRVINE, 2000

D.S. Irvine

Male reproductive health: cause of concern?

Andrologia, **32**, 195-208 (2000)

JAMES, 1997

K.J. James, M.A. Stack

Rapid determination of volatile organic compounds in environmentally hazardous wastewaters using solid phase microextraction

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **358**, 833-837 (1997)

JOHNSON, 1991

W.E. Johnson, N.J. Fendinger, J.R. Plimmer

Solid-phase extraction of pesticides from water: Possible interferences from dissolved organic matter

Analytical Chemistry, **63**, 1510-1513 (1991)

JOHNSON, 2000

A.C. Johnson, A. Belfroid, A. Di Corcia

Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent

The Science of the Total Environment, **256**, 163-173 (2000)

KNAPP, 1979

D.R. Knapp

Handbook of analytical derivatization reactions

John Wiley & Sons, New York/Chichester/Brisbane/Toronto/Singapore (1979)

KROMIDAS, 2000

S. Kromidas

Handbuch Validierung in der Analytik

WILEY-VCH Weinheim/New York/Chichester/Brisbane/Singapore/Toronto (2000)

KUCH, 2000

H.M. Kuch, K. Ballschmiter

Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/l-level

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **366**, 392-395 (2000)

LAGANA, 2000

A. Lagana, A. Bacaloni, G. Fago, A. Marino

Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry, **14**, 401-407 (2000)

LAMBROPOULOU, 2000

D. Lambropoulou, T. Sakellarides, T. Albanis

Determination of organophosphorus insecticides in natural waters using SPE-disks and SPME followed by GC/FTD and GC/MS

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **368**, 616-623 (2000)

LANGENFELD, 1996

J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller

Optimizing split/splitless injection port parameters for solid-phase microextraction

Journal of Chromatography A, **740**, 139-145 (1996)

LEWIS, 1979

K.M. Lewis, R.D. Archer

pKa values of estrone, 17 beta-estradiol and 2-methoxyestrone

Steroids, **34 (5)**, 485-499 (1979)

LIAO, 1996

J-L. Liao, C.-M. Zeng, S. Hjerten, J. Pawliszyn

Solid phase micro extraction of biopolymers, exemplified with adsorption of basic proteins onto fiber coated with polyacrylic acid

Journal of Microcolumn Separations, **8 (1)**, 1-4 (1996)

LIPINSKI, 2000

J. Lipinski

Automated multiple solid phase micro extraction. An approach to enhance the limit of detection for the determination of pesticides in water

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **367**, 445-449 (2000)

LISKA, 2000

I. Liska

Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview

Journal of Chromatography A, **885**, 3-16 (2000)

LORD, 2000

H. Lord, J. Pawliszyn

Evolution of solid-phase microextraction technology

Journal of Chromatography A, **885**, 153-193 (2000)

LOUCH, 1992

D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn

Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers

Analytical Chemistry, **64**, 1187-1199 (1992)

MARCE, 2000

R.M. Marce, F. Borrull

Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds

Journal of Chromatography A, **885**, 273-290 (2000)

MATISOVA, 1995

E. Matisova, S. Skrabakova

Carbon sorbents and their utilization for the preconcentration of organic pollutants in environmental samples

Journal of Chromatography A, **707**, 145-179 (1995)

MATSON, 1983

W. Matson

U.S. Patent 4, 404, 065 (1983)

MEISENHEIMER, 2000

M. Meisenheimer, T.A. Ternes

Verfahren zur Bestimmung der Antiepileptika Carbamazepin und Primidon in Wasser mittels GC/MS nach Derivatisierung

Vom Wasser, **94**, 203-212 (2000)

MERCK, 1989

The Merck Index 11

An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals

Eleventh Edition

Susan Budavari (Editor)

Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., USA (1989)

METROHM

Metrohm Application Bulletin Nr. 128/1 d,f,e

Elektrochemische Detektion in der HPLC

MÖDER, 1997

M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp

Determination of phenolic compounds in waste water by solid-phase micro extraction

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **357**, 326-332 (1997)

MOEDER, 2000

M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp

Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples

Journal of Chromatography A, **873**, 95-106 (2000)

MÜLLER, 1961

K. Müller

Die Bestimmung der Kohlenstoff-Mehrfachbindung

Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, **181**, 126-147 (1961)

NILSSON, 1997

T. Nilsson, R. Ferrari, S. Facchetti

Inter-laboratory studies for the validation of solid-phase microextraction for the quantitative analysis of volatile organic compounds in aqueous samples

Analytica Chimica Acta, **356**, 113-123 (1997)

OHLENBUSCH, 2000

G. Ohlenbusch, M.U. Kumke, F.H. Frimmel

Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase micro-extraction

The Science of the Total Environment, **253**, 63-74 (2000)

OKEYO, 1997

P. Okeyo, S.M. Rentz, N.H. Snow

Analysis of steroids from human serum by SPME with headspace derivatization and GC/MS

Journal of High Resolution Chromatography, **20**, 171-173 (1997)

OKEYO, 1998

P.D. Okeyo, N.H. Snow

Analysis of estrogens and anabolic steroids by SPME with on-fiber derivatization and GC/MS

Journal of Microcolumn Separations, **10 (7)**, 551-556 (1998)

OOSTERKAMP, 1997

A.J. Oosterkamp, B. Hock, M. Seifert, H. Irth

Novel monitoring strategies for xenoestrogens

Trends in Analytical Chemistry, **16**, 544-553 (1997)

OTU, 1993

E. Otu, J. Pawliszyn

Solid phase micro extraction of metal ions

Mikrochimica Acta, **112**, 41-46 (1993)

PAGE, 2000

B.D. Page, G. Lacroix

Analysis of volatile contaminants in vegetable oils by headspace solid-phase micro-extraction with Carboxen-based fibres

Journal of Chromatography A, **873**, 79-94 (2000)

PAN, 1997

L. Pan, J. Pawliszyn

Derivatization/solid-phase microextraction: New approach to polar analytes

Analytical Chemistry, **69**, 196-205 (1997)

PASCHKE, 1998

A. Paschke, P. Popp, G. Schüürmann

Water solubility and octanol/water-partitioning of hydrophobic chlorinated organic substances determined by using SPME/GC

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **360**, 52-57 (1998)

PAWLISZYN, 1997

J. Pawliszyn

Solid phase microextraction: theory and practice

Wiley-VCH, New York (1997)

PENALVER, 2002

A. Penalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce

Method based on solid-phase microextraction – high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples

Journal of Chromatography A, **964**, 153-160 (2002)

PH. EUR., 1997

Europäisches Arzneibuch

3. Ausgabe

Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart / Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn (1997)

POERSCHMANN, 1997

J. Poerschmann, Z. Zhang, F.-D. Kopinke, J. Pawliszyn

Solid phase microextraction for determining the distribution of chemicals in aqueous matrices

Analytical Chemistry, **69**, 597-600 (1997)

PURDOM, 1994

C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter

Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works

Chemistry and Ecology, **8**, 275-285 (1994)

RANNEY, 1977

R.E. Ranney

Comparative metabolism of 17 α -ethinylsteroids used in oral contraceptives

Journal of Toxicology and Environmental Health, **3**, 139-166 (1977)

RATHNER, 1979

M. Rathner, M. Sonneborn

Biologisch wirksame Östrogene in Trink- und Abwasser

Forum Städte-Hygiene, **30**, 45-49 (1979)

RODRIGUEZ, 2000

I. Rodriguez, M.P. Llompart, R.Cela

Solid-phase extraction of phenols

Journal of Chromatography A, **885**, 291-304 (2000)

ROTH, 1990

H.J. Roth, K. Eger, R. Troschütz

Pharmazeutische Chemie II – Arzneistoffanalyse

Reaktivität – Stabilität – Analytik

3., neubearbeitete Auflage

Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York (1990)

ROUTLEDGE, 1998

E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter

Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.

2. In vivo responses in trout and roach

Environmental Science and Technology, **32**, 1559-1565 (1998)

RURAINSKI, 1977

R.D. Rurainski, H.J. Theiss, W. Zimmermann

Über das Vorkommen von natürlichen Östrogenen im Trinkwasser

gwf-wasser/abwasser, **118 (6)**, 288-291 (1977)

SABIK, 2000

H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau

Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters

Journal of Chromatography A, **885**, 217-236 (2000)

SAMSON, 1996

C. Samson, V.N. Mallet, J. Doull, G. Brun

Microextraction of chlorinated benzenes and selected organochlorines from environmental water

International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, **64**, 111-121 (1996)

SANTOS, 1996

F.J. Santos, M.T. Galceran, D. Fraisse

Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile organic compounds in water

Journal of Chromatography A, **742**, 181-189 (1996)

SCHEPPERS WERCINSKI, 1999

S.A. Scheppers Wercinski (Editor)

Solid phase microextraction – A practical guide

Marcel Dekker, New York/Basel (1999)

SCHILLING, 1998

R. Schilling, P.J. Clarkson, M. Cooke

Enhanced recovery of chlorophenols from surface waters using polymer based extraction cartridges

Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **360**, 90-94 (1998)

SCHLETT, 1996

C. Schlett, B. Pfeifer

Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern

Vom Wasser, **87**, 327-333 (1996)

SCHWOERBEL, 1993

J. Schwoerbel

Einführung in die Limnologie

7. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / Jena (1993)

SNOW, 2000

N.H. Snow

Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices

Journal of chromatography A, **885**, 445-455 (2000)

SPENGLER, 1999

P. Spengler, W. Körner, J.W. Metzger

Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen

Vom Wasser, **93**, 141-157 (1999)

STAERK, 2000

U. Staerk, W.R. Külpmann

High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography–mass spectrometry

Journal of Chromatography B, **745**, 399-411 (2000)

STAN, 1992

H.J. Stan, M. Linkerhägner

Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methyl-propionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie
Vom Wasser, **79**, 75-88 (1992)

STAN, 1994

H.-J. Stan, T. Heberer, M. Linkerhägner

Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System
– Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser ? –
Vom Wasser, **83**, 57-68 (1994)

STEGER-HARTMANN, 1996

T. Steger-Hartmann, K. Kümmerer, J. Schecker

Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry
Journal of Chromatography A, **726**, 179-184 (1996)

STEGER-HARTMANN, 1997

T. Steger-Hartmann, K. Kümmerer, A. Hartmann

Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water
Ecotoxicology and Environmental Safety, **36**, 174-179 (1997)

STULIK, 1981

K. Stulik, V. Pacakova

Electrochemical detection techniques in high-performance liquid chromatography
Journal of Electroanalytical Chemistry, **129**, 1-24 (1981)

STUMPF, 1996

M Stumpf, T.A. Ternes, K. Haberer, W. Baumann

Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern
Vom Wasser, **87**, 251-261 (1996)

STUMPF, 1998

M. Stumpf, T.A. Ternes, K. Haberer, W. Baumann

Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt

Vom Wasser, **91**, 291-303 (1998)

SULING, 2000

V. Suling, W. Thiemann

Nachweis ausgewählter Pharmaka in Bremer Wässern

Vom Wasser **95**, 269-278 (2000)

SUMPTER, 1995

J.P. Sumpter, S. Jobling

Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment

Environmental Health Perspectives, **103**, 173-178 (1995)

SUPELCO, 1996

Data Sheet T794123F: Solid phase microextraction fiber assemblies

Supelco, 1996

SYRRES

Syracuse Research Corporation

Kow-Database

<http://esc.syrres.com/>

TERNES, 1999

T.A. Ternes, M. Stumpf, J. Mueller, K.Haberer, R.-D. Wilken, M. Servos

Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants –

I. Investigations in Germany, Canada and Brazil

The Science of the Total Environment, **225**, 81-90 (1999)

TOPPARI, 1998

J. Toppari, N.E. Skakkebaek

Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters

Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism, **12 (1)**, 143-156 (1998)

VAN DER LINDEN, 1980

W.E. van der Linden, J.W. Dieker

Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry

Analytica Chimica Acta , **119**, 1-24 (1980)

WEGENER, 1999

G. Wegener, J. Persin, F. Karrenbrock, O. Rörden, I. Hübner

Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugate in der aquatischen Umwelt

Vom Wasser, **92**, 347-360 (1999)

WEIGEL, 2002

S. Weigel, J. Kuhlmann, H. Hühnerfuss

Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea

The Science of the Total Environment, **295**, 131-141 (2002)

WELLS, 2000

M.J.M. Wells, L.Z. Yu

Solid-phase extraction of acidic herbicides

Journal of Chromatography A, **885**, 237-250 (2000)

WERRES, 2000

F. Werres, J. Stien, P. Balsaa, A. Schneider, P. Winterhalter, H. Overath

Automatisierte Bestimmung polarer Arzneimittelrückstände in Wässern mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) und Derivatisierung

Vom Wasser, **94**, 135-147 (2000)

YANG, 1994

X. Yang, T.L. Peppard

Solid-phase microextraction for flavor analysis

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **42**, 1925-1930 (1994)

YANG, 1998

Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee

Adsorption versus absorption of polychlorinated biphenyls onto solid-phase micro-extraction coatings

Analytical Chemistry, **70**, 1866-1869 (1998)

YASHIKI, 1995

M. Yashiki, T. Kojima, T. Miyazaki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, K. Hara

Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring

Forensic Science International, **76**, 169-177 (1995)

YUAN, 2001

H. Yuan, W.M. Mullett, J. Pawliszyn

Biological sample analysis with immunoaffinity solid-phase microextraction

The Analyst, **126 (8)**, 1456-1461 (2001)

ZAMBONIN, 2001

C.G. Zambonin, L. Monaci, A. Aresta

Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase micro-extraction and high performance liquid chromatography

Food Chemistry, **75**, 249-254 (2001)

ZAPF, 1995

A. Zapf, R. Heyer, H.-J. Stan

Rapid micro liquid-liquid extraction method for trace analysis of organic contaminants in drinking water

Journal of Chromatography A, **694**, 453-461 (1995)

ZHANG, 1993

Z. Zhang, J. Pawliszyn

Headspace solid-phase microextraction

Analytical Chemistry, **65**, 1843-1852 (1993)

ZHIHONG, 1999

M. Zhihong, L. Xiaohui, F. Weiling

A new sandwich-type assay of estrogen using piezoelectric biosensor immobilized with estrogen response element

Analytical Communications, **36**, 281-283 (1999)

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin, 31. März 2003